

Djanira Valéria Campos do Nascimento

**MODIFICADORES GENÉTICOS DA
GRAVIDADE DA ANEMIA NAS CRIANÇAS
COM DREPANOCITOSE**



Universidade do Algarve

Faculdade de Ciências e Tecnologias

2024

Djanira Valéria Campos do Nascimento

**MODIFICADORES GENÉTICOS DA
GRAVIDADE DA ANEMIA NAS CRIANÇAS
COM DREPANOCITOSE**

Mestrado em Biologia Molecular e Microbiana

Trabalho efetuado sob a orientação de:

Doutora Paula Faustino - Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge

Professora Doutora Leonor Cancela – Universidade do Algarve



Universidade do Algarve

Faculdade de Ciências e Tecnologias

2024

MODIFICADORES GENÉTICOS DA GRAVIDADE DA ANEMIA NAS CRIANÇAS COM DREPANOCITOSE

Declaração de autoria de trabalho

Declaro ser a autora deste trabalho, que é original e inédito. Autores e trabalhos consultados estão devidamente citados no texto e constam da listagem de referências incluída.

X

Djanira Nascimento

©Copyright: Djanira Nascimento

A Universidade do Algarve reserva para si o direito, em conformidade com o disposto no Código do Direito de Autor e dos Direitos Conexos, de arquivar, reproduzir e publicar a obra, independentemente do meio utilizado, bem como de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição para fins meramente educacionais ou de investigação e não comerciais, conquanto seja dado o devido crédito ao autor e editor respetivos.

Dedicatória

À minha mãe e às minhas irmãs.

Agradecimentos

A finalização de um projeto é para mim a oportunidade de iniciar um novo sonho, é o começar de uma nova fase de vida com novos obstáculos e novas perspectivas de como os ultrapassar.

O presente projeto é uma parte de mim, uma parte do que sou em todas as vertentes. Como diz uma amiga, a caminhada “é individual, mas não se faz sozinha”, desta forma, é também um pouco de cada pessoa que me acompanhou neste percurso; umas vezes tão pesado, outras vezes tão satisfatório. Sim, como em todas as histórias, teve a participação de vários contributos, que sem eles nada seria possível. Assim, deixo o meu agradecimento a todos vós, que de alguma forma permitiram concretizar este trabalho.

Gostaria de agradecer primeiramente à Jeová, onde recorri em todos os momentos de aflição, mesmo com tantas dúvidas e questões existenciais, sempre senti a Tua presença.

Agradeço ao Dr. Fernando de Almeida, presidente do conselho diretivo do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA), e à Dra. Glória Isidro, coordenadora do Departamento de Genética Humana (DGH) do INSA, por permitirem a realização deste projeto, respetivamente, na instituição e departamento que dirigem, por dispensarem o seu tempo para me receberem com muita simpatia.

Agradeço à minha orientadora Doutora Paula Faustino por ter depositado a sua confiança em mim, por dar-me oportunidade e o privilégio de realizar este trabalho ao seu lado no Grupo de Investigação em Hemoglobinopatias, Metabolismo do Ferro e Patologias Associadas, da Unidade de Investigação e Desenvolvimento do DGH/INSA. Agradeço ainda por transmitir-me tanto do seu conhecimento, por dar-me a liberdade de explorar a minha criatividade e por estar sempre pronta a tirar-me qualquer dúvida. Sou muito grata por ter tido a oportunidade de trabalhar ao lado de uma mulher que transborda conhecimento, alguém que vê o mundo e a ciência com uma perspetiva tão assertiva ao ponto de traçar tantos trabalhos na área das hemoglobinopatias tão bem delineados. Para mim, é sem dúvida uma inspiração.

Sou grata por ter encontrado bons companheiros de laboratório, a todos vós, obrigada. À Rita Pena, colega e amiga que o INSA me ofereceu, obrigada pela colaboração da implementação da metodologia “*multiplex gap-PCR*” (foi bastante desafiador, mas sem dúvida uma animação), por fazeres os meus dias mais divertidos, pelas trocas de ideias e de conselhos. Um especial “obrigada” ao Dr. Pedro Lopes que nos recebeu de braços abertos e que com tanta paciência, humanidade e empatia ensinou-nos cada técnica e lapidou as arestas científicas e profissionais de cada mestrandia integrada no laboratório. Obrigada por respeitares o tempo de aprendizagem de cada uma de nós, novatas que iniciavam este extraordinário percurso.

Aos profissionais de saúde que, previamente a mim, participaram e permitiram o desenvolvimento deste projeto: às médicas pediatras, Dras. Paula Kjölkerström, Raquel Maia, Alexandra Dias e Teresa Ferreira; aos investigadores, Doutor João Lavinha e Mestre Andreia Coelho.

A todos os membros da Unidade de Tecnologia e Inovação (UTI) do DGH/INSA, pelo apoio técnico prestado na metodologia de Sequenciação de Sanger. Também aos

técnicos da Unidade de Genética Molecular do DGH/INSA, pelo apoio técnico prestado na extração de DNAs.

A todos os meus professores e educadores por me transmitirem uma das coisas mais valiosas que existe: o conhecimento. Sei que por ser algo tão valioso poucos são os que partilham com tanto amor e dedicação como estes que passaram pela minha vida. Um agradecimento especial à minha primeira professora, Professora Maria Conceição Lopes, por me ter dado as bases deste alicerce, sem ela não teria construído o edifício que sou hoje e não teria a oportunidade de continuar a reconstruir-me dia após dia. E como não poderia deixar de ser, à minha querida professora e orientadora Professora Doutora Leonor Cancela. Uma das mulheres que mais admiro, que ensina de genética de maneira tão simples, mas tão fascinante que acabou por me contagiar, provando-me que o mundo da ciência vai muito além daquilo que conhecemos. Obrigada a esta grande senhora que incentiva tanto os seus alunos ao ponto de termos a convicção de que não há barreiras impossíveis de serem destruídas.

Obrigada ao meu “coorientador” de todas as horas, Gil Martins, por estar sempre disponível para tirar todas as minhas dúvidas e que por meio de tantas trocas de ideias, ofereceu-me mais conhecimento.

A todos os meus amigos, em especial à Ana Maria, Ana Sofia, Jaime Viana e Rui Silva. Começa agora uma nova etapa da minha vida. Vocês como todos citados, ajudaram-me a ser a pessoa que sou hoje, cada um de vós ofereceu-me um pouco do que são sem me pedirem nada em troca. Sou muito grata por todas as vivências, por uns dias serem dedicados aos sorrisos e outros à partilha de mágoas. Vocês, para além de me oferecerem conhecimento, deram-me experiências de vida. Obrigada pelo vosso apoio e incentivo nos dias em que pouco me faltou para baixar os braços. Obrigada por limparem as minhas lágrimas. Cada um de vós é transportado comigo com muito carinho e orgulho no meu coração (*emoji* coração e piscadela).

Ao meu parceiro de destino, João Cardoso, tenho a dizer que a vida é feita de altos e baixos, acho que percebes melhor disso porque ECG's é mais a tua praia. Falando em coisas do coração, devo dizer que o meu pertence-te. Percebi que há poucas coisas que me fazem acreditar no destino, no entanto, não posso negar que ele nos deu uma ajuda preciosa. Várias vezes disse e volto a dizer “obrigada por me teres dado o privilégio de sentir algo que poucas pessoas chegam a sentir, obrigada por me ensinares o que é o amor”. Sei que é amor porque o teu toque tem a capacidade de me curar quando estou doente, um beijo teu é capaz de me fazer esquecer de todos os problemas e um abraço é capaz de me fazer acreditar que o mundo afinal não é um lugar assim tão mau. O teu apoio foi o que eu precisava, a verdade é que vou ter contigo sempre que quero voltar para mim. Obrigada por me fazeres sorrir, por limpares as minhas lágrimas, por me incentivares a ir atrás dos meus sonhos, por cuidares de mim “na saúde e na doença”. Tenho muito mais a agradecer, mas o melhor é mesmo resumir num “obrigada por tudo”. ...e que pela estrada da vida, sejas sempre o meu amor... (*emoji* coração roxo).

À minha mãe Esperança e às minhas irmãs Divânia e Lisdália, OBRIGADA! É uma palavra muito simples, mas o seu significado é extenso. Mãe, o teu nome é tão forte que em tudo tento encontrar-te, tenho a certeza de que o teu nome não foi dado por acaso, Jeová já sabia que serias essa pessoa tão forte, tão guerreira, tão admirável. Sei que nem sempre a vida foi sorridente e que por vezes eu contribuí para que esse sorriso desvanecesse do vosso rosto. Não tenho como não me emocionar ao relembrar de tudo o que passamos para hoje estar aqui a dedicar este trabalho que é um pequeno pedaço do meu ser, mas repleto do meu e do vosso esforço. Mais de que vos agradecer, tenho de me

desculpar. Desculpem-me pelos dias de preocupação, pelas noites sem dormirem e pelos períodos de tanta incerteza. Uma vez chamaram-me de “Fénix” por que como ela, renasci; o que não sabem, é que vocês têm uma importância tão grande para mim que por várias vezes fortaleci-me não por mim, mas porque sabia que se não o fizesse, estaria a deixar uma mágoa profunda nas pessoas mais importantes da minha vida. O meu amor por vocês é incondicional. Tenho muito a agradecer a Jeová; porque apesar de nem tudo ser fácil, Ele ofereceu-me as três pessoas mais capacitadas a aturar alguém como eu. Obrigada à minha sobrinha Yohanna por inconscientemente trazer mais motivos para eu e toda a família sorrir.

A todos, um grande *NGA SAKIDILA* (em português, **OBRIGADA**)!

Resumo

A drepanocitose é causada pela alteração c.20A>T no gene *HBB* que origina hemoglobina S (HbS) e deformação dos eritrócitos. A doença é de manifestação heterogénea, mas caracteriza-se por anemia hemolítica crónica e crises vaso-oclusivas que se manifestam através de dor extrema e danos em diversos órgãos. O presente estudo teve como objetivos caracterizar regiões polimórficas em *HBA*, *HBG2*, *CYB5R3*, e no agrupamento génico da β -globina, e investigar os seus possíveis efeitos modificadores sobre os fenótipos da drepanocitose.

Foram estudadas 81 crianças com drepanocitose, previamente avaliadas do ponto de vista clínico, hematológico e bioquímico. Para a genotipagem dos locais de interesse usou-se PCR, Multiplex Gap-PCR, PCR-RFLP e Sequenciação de Sanger.

A co-herança da α -talassémia com a drepanocitose foi observada em 43,2% destas crianças e revelou-se benéfica, traduzindo-se por: *i*) maior contagem de eritrócitos e menor gravidade da anemia; *ii*) redução significativa nos biomarcadores de hemólise, bilirrubina e reticulócitos. Igualmente benéfico é ter HbF elevada ($\geq 10\%$) uma vez que confere a estes doentes menor gravidade na sua anemia hemolítica. No gene *HBG2*, o rs7482144_alelo T apresentou uma frequência de 15% e foi associado a: *i*) níveis de HbF elevados; *ii*) diminuição dos parâmetros hemolíticos e de HbS; *iii*) redução da anemia; *iv*) menor frequência das comorbilidades clínicas, com exceção das cardiopatias. Observou-se que 56,8% dos doentes são Bantu/Bantu e 9,9% Senegal/Senegal e que são estes últimos que apresentam níveis de HbF mais elevados e anemia menos grave. No gene *CYB5R3*, o rs1800457_alelo G apresentou uma frequência de 35% e aparenta ter um papel nocivo, uma vez que foi associado a anemia severa e maior nível de hemólise. Clinicamente, foi verificado uma maior tendência para comorbilidades no grupo detentor do alelo G.

O nosso estudo contribuiu para o conhecimento do papel modificador de alguns fatores genéticos sobre gravidade dos fenótipos, sobretudo hematológico e bioquímico, das crianças com drepanocitose que vivem em Portugal.

Palavras-chave: Drepanocitose, modificadores genéticos, hemoglobina fetal, α -talassémia, *HBG2*, *CYB5R3*

Abstract

Sickle Cell Anemia is caused by the c.20A>T alteration in the *HBB* gene that originates hemoglobin S (HbS) and the deformation of erythrocytes. The disease has heterogeneous manifestations but is characterized by chronic haemolytic anaemia and vaso-occlusive crises that are manifested by extreme pain and damage to various organs. This study aimed to characterize polymorphic regions in *HBA*, *HBG2*, *CYB5R3*, and the β -globin gene cluster, and to investigate their possible modifying effects on sickle cell anemia phenotypes.

A total of 81 children with sickle cell anemia were studied, who had previously been clinically, hematologically and biochemically evaluated. PCR, multiplex gap-PCR, PCR-RFLP and Sanger sequencing were used to genotype the sites of interest.

The co-inheritance of α -thalassemia with sickle cell anemia was observed in 43.2% of these children and proved to be beneficial, resulting in: *i*) a higher red blood cell counts and less severe anemia; *ii*) a significant reduction in the biomarkers of hemolysis, bilirubin and reticulocytes. Equally beneficial is having a high HbF ($\geq 10\%$) as it gives these patients less severe hemolytic anemia. In the *HBG2* gene, rs7482144_allele T had a frequency of 15% and was associated with: *i*) high HbF levels; *ii*) a reduction in hemolytic parameters and HbS; *iii*) a reduction in anemia; *iv*) a lower frequency of clinical comorbidities, except for heart disease. It was observed that 56.8% of the patients were Bantu/Bantu and 9.9% Senegal/Senegal, and that it was the latter who had higher HbF levels and less severe anemia. In the *CYB5R3* gene, rs1800457_allele G showed a frequency of 35% and appears to play a harmful role, since it was associated with severe anemia and higher levels of hemolysis. Clinically, there was a greater tendency for comorbidities in the group with the G allele.

Our study has contributed to the knowledge of the modifying role of some genetic factors on the severity of the phenotypes, especially hematological and biochemical, of children with sickle cell anemia living in Portugal.

Keywords: Sickle cell anemia, genetic modifiers, fetal hemoglobin, α -thalassemia, *HBG2*, *CYB5R3*

Índice de matérias

1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	O SANGUE, CONSTITUIÇÃO E FUNÇÕES.....	1
1.2	AS HEMOGLOBINAS HUMANAS – FUNÇÃO, ESTRUTURA E ONTOGENIA.....	1
1.3	AS PATOLOGIAS RELACIONADAS COM A HEMOGLOBINA – AS HEMOGLOBINOPATIAS	5
1.3.1	<i>Defeitos quantitativos – Talassémias</i>	<i>6</i>
1.3.1.1	A α -Talassémia	7
1.3.1.2	A β -Talassémia	9
1.3.2	<i>Defeitos qualitativos – Variantes da Hemoglobina</i>	<i>10</i>
1.4	A DREPANOCITOSE	11
1.4.1	<i>Distribuição geográfica.....</i>	<i>12</i>
1.4.2	<i>Fisiopatologia.....</i>	<i>13</i>
1.4.3	<i>Manifestações clínicas.....</i>	<i>16</i>
1.4.3.1	Dor	16
1.4.3.2	Anemia hemolítica crónica e as crises de anemia aguda	18
1.4.3.3	Dactilite.....	18
1.4.3.4	Úlceras nas pernas.....	18
1.4.3.5	Osteonecrose e doenças ósseas.....	19
1.4.3.6	Auto-esplenismo e infeções.....	19
1.4.3.7	Síndrome torácica aguda	20
1.4.3.8	Priapismo	21
1.4.3.9	Hipertensão pulmonar	21
1.4.3.10	Acidente vascular cerebral	22
1.4.3.11	Complicações cardiovasculares.....	22
1.4.3.12	Problemas psicológicos	23
1.4.3.13	Outras complicações	23
1.4.4	<i>Diagnóstico.....</i>	<i>24</i>
1.4.5	<i>Tratamentos.....</i>	<i>25</i>
1.4.5.1	A Hidroxiureia e os outros fármacos inovadores	25
1.4.5.2	Transfusão de sangue	27
1.4.5.3	Transplante alogénico de células-tronco hematopoiéticas.....	28
1.4.5.4	Terapia génica	29
1.4.6	<i>Modificadores da gravidade da drepanocitose</i>	<i>30</i>
1.4.6.1	A Hemoglobina fetal	30
1.4.6.2	O polimorfismo rs7482144 no gene <i>HBG2</i>	31
1.4.6.3	Os haplótipos no agrupamento génico da β -globina.....	32
1.4.6.4	A α -talassémia.....	32
1.4.6.5	O polimorfismos rs1800457 no gene <i>CYB5R3</i>	32
2	OBJETIVOS.....	35
3	MATERIAIS E MÉTODOS	36
3.1	CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA.....	36

3.1.1	<i>Amostra populacional</i>	36
3.1.2	<i>Extração de DNA</i>	36
3.2	REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (<i>POLYMERASE CHAIN REACTION – PCR</i>).....	37
3.2.1	<i>Eletroforese em gel de agarose</i>	39
3.3	<i>MULTIPLEX GAP-PCR</i>	40
3.4	RESTRICÇÃO ENZIMÁTICA (<i>PCR - RESTRICTION FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM</i>)	42
3.5	SEQUENCIAÇÃO DE SANGER.....	43
3.6	HAPLÓTIPOS NO AGRUPAMENTO GÉNICO DA β -GLOBINA	45
3.7	ESTUDO BIOINFORMÁTICO	45
3.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	46
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
4.1	CARACTERIZAÇÃO DEMOGRÁFICA DA POPULAÇÃO EM ESTUDO	47
4.2	CARACTERIZAÇÃO DOS PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS, BIOQUÍMICOS E CLÍNICOS.....	51
4.3	DIAGNÓSTICO DE ALTERAÇÕES NOS GENES <i>HBA</i> : α -TALASSÉMIA	54
4.3.1	<i>Associação da α-talassémia com a gravidade da drepanocitose</i>	57
4.4	POLIMORFISMO NO GENE <i>HBG2</i> - rs7482144 (C>T)	63
4.4.1	<i>Estudos de associação do polimorfismo rs7482144 com a gravidade da drepanocitose</i> ... 66	
4.5	HAPLÓTIPOS NO AGRUPAMENTO GÉNICO DA β -GLOBINA.....	69
4.5.1	<i>Estudos de associação dos haplótipos com a gravidade da drepanocitose</i>	72
4.6	POLIMORFISMO NO GENE <i>CYB5R3</i> - rs1800457 (C>G)	76
4.6.1	<i>Estudos de associação do polimorfismo rs1800457 com a gravidade dos fenótipos hematológicos e bioquímicos</i>	79
4.7	INFLUÊNCIA DA HEMOGLOBINA FETAL NA GRAVIDADE DA DREPANOCITOSE.....	85
5	CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS	90
6	REFERÊNCIAS	94
7	ANEXOS	105

Índice de figuras

Figura 1.1. Representação da constituição da hemoglobina A.....	3
Figura 1.2. Ontogenia das hemoglobinas humanas.	4
Figura 1.3. Representação esquemática do mecanismo que dá origem às deleções comuns da α -talassémia.	8
Figura 1.4. Esfregaço de sangue periférico de um indivíduo com drepanocitose.	11
Figura 1.5. Representação esquemática da polimerização da HbS.	14
Figura 1.6. Representação esquemática da morfologia dos eritrócitos falciformes.	14
Figura 3.1. Representação esquemática do diagnóstico da α -talassémia através do <i>Multiplex Gap-PCR</i>	41
Figura 3.2. Representação esquemática da separação eletroforética dos produtos da restrição enzimática com <i>Xmn I</i> do promotor do gene <i>HBG2</i> previamente amplificado por PCR.....	43
Figura 4.1. Distribuição por idade e por sexo da população.	47
Figura 4.2. Distribuição da origem geográfica da população de participantes.....	49
Figura 4.3. Naturalidade dos progenitores das crianças naturais de Portugal.	50
Figura 4.4. Diagnóstico da α -talassémia através do <i>Multiplex Gap-PCR</i>	55
Figura 4.5. Frequência dos genótipos de α -globina detetada nas 81 crianças com drepanocitose.	56
Figura 4.6. Visualização de um gel após separação eletroforética dos produtos de amplificação por PCR do promotor do gene <i>HBG2</i>	64
Figura 4.7. Registo fotográfico de um gel após separação eletroforética dos produtos da restrição enzimática do promotor do gene <i>HBG2</i> com o enzima <i>Xmn I</i>	64
Figura 4.8. Frequência dos genótipos do polimorfismo rs7482144 no gene <i>HBG2</i>	65
Figura 4.9. Concentração de hemoglobina e percentagem de HbF em função do genótipo em rs7482144.	68

Figura 4.10. Frequência dos genótipos nas crianças participantes do estudo.....	70
Figura 4.11. Visualização em gel de agarose dos produtos da amplificação do exão 5 do gene <i>CYB5R3</i> de algumas amostras.....	77
Figura 4.12. Eletroferograma dos possíveis resultados da sequenciação de Sanger para a caracterização do polimorfismo rs1800457 no exão 5 do gene <i>CYB5R3</i>	77
Figura 4.13. Frequência dos genótipos do polimorfismo rs1800457 no gene <i>CYB5R3</i> .	78
Figura 4.14. Resultado da previsão do <i>software PolyPhen-2</i> para a variante rs1800457 ao nível da proteína <i>CYB5R3</i>	79

Índice de tabelas

Tabela 1.1 Principais haplótipos associados à drepanocitose.....	12
Tabela 3.1. Identificação dos genes em foco e metodologia utilizada para a detecção da respectiva variante genética.....	38
Tabela 4.1. Origem geográficas da população estudada e dos seus progenitores	48
Tabela 4.2. Estatística descritiva dos parâmetros hematológicos e bioquímicos das crianças drepanocíticas estudadas	53
Tabela 4.3. Categorias da gravidade da anemia	53
Tabela 4.4. Frequência relativa das complicações clínicas	54
Tabela 4.5. Associação entre o fenótipo hematológico e bioquímico e os genótipos de α -globina	58
Tabela 4.6. Associação entre o fenótipo clínico e os genótipos de α -globina.....	60
Tabela 4.7. Associação entre o fenótipo hematológico e hemolítico e o SNP rs7482144 do gene <i>HBG2</i> segundo o modelo dominante	66
Tabela 4.8. Associação entre o fenótipo hematológico e hemolítico e o SNP rs7482144 do gene <i>HBG2</i> segundo o modelo codominante	68
Tabela 4.9. Associação entre o fenótipo clínico e o SNP rs7482144 do gene <i>HBG2</i>	69
Tabela 4.10. Frequência dos genótipos com base na naturalidade dos progenitores das crianças estudadas.....	71
Tabela 4.11. Associação entre o fenótipo hematológico e bioquímico e os diferentes genótipos do agrupamento génico da β -globina.....	72
Tabela 4.12. Associação entre o fenótipo clínico e os diferentes genótipos do agrupamento génico da β -globina	75
Tabela 4.13. Associação entre o fenótipo hematológico e hemolítico e o SNP rs1800457 do gene <i>CYB5R3</i>	80
Tabela 4.14. Associação entre o fenótipo hematológico e hemolítico das crianças com anemia severa e o SNP rs1800457 do gene <i>CYB5R3</i>	82

Tabela 4.15. Associação entre o fenótipo clínico e o polimorfismo rs1800457 C>G....	84
Tabela 4.16. Associação entre o fenótipo hematológico e hemolítico e os níveis de HbF	86
Tabela 4.17. Associação entre o fenótipo clínico e os níveis de HbF	88
Tabela 7.1. Identificação, concentração e conteúdo em CG dos <i>primers</i> usados no <i>Multiplex Gap</i> -PCR para detecção das deleções α 3,7 e α 4,2	105
Tabela 7.2. Reagentes e condições de <i>Multiplex Gap</i> -PCR e de eletroforese para a detecção simultânea das deleções α -talassémicas de 3,7kb e 4,2kb localizadas no agrupamento génico da α -globina	106
Tabela 7.3. Identificação, concentração e conteúdo em CG dos <i>primers</i> para detecção do polimorfismo rs7482144	107
Tabela 7.4. Reagentes e condições de PCR para amplificação do promotor do gene <i>HBG2</i>	108
Tabela 7.5. Reagentes e condições de restrição da enzima <i>Xmn I</i> para detecção do polimorfismo rs7482144 localizado a montante do gene <i>HBG2</i>	109
Tabela 7.6. Identificação, concentração e conteúdo em CG dos <i>primers</i> para detecção do polimorfismo rs1800457 no gene <i>CYB5R3</i>	110
Tabela 7.7. Reagentes e condições de PCR para detecção do polimorfismo rs1800457 localizado no gene <i>CYB5R3</i>	111
Tabela 7.8. Composição dos tampões de PCR e de eletroforese.....	112
Tabela 7.9. Aminoácidos e respetivos símbolos IUPAC - IUBMB	113
Tabela 7.10. Código genético. Correspondência entre o tripleto de nucleótidos (codão) de mRNA e o aminoácido equivalente.....	114

Listas de abreviaturas, siglas e símbolos

A – Adenina

Ala – Alanina

AVC – Acidente vascular cerebral

BrEt – Brometo de etídio

BSA – Albumina sérica bovina

C – Citosina

CD36 – *Cluster of differentiation 36*

CO – Monóxido de carbono

CO₂ – Dióxido de carbono

CRISPR – Repetições palindrômicas curtas agrupadas e regularmente interespaçadas
(*clustered regularly interspaced short polindromic repeats*)

CYB5R3 – Citocromo b5 redutase 3

ddNTP – Didesoxirribonucleotídeos trifosfatados

DesoxiHbS – Desoxi-hemoglobinas S

DGS – Direção geral de saúde

dL – Decilitro

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DNase – Desoxirribonuclease

dNTP – Desoxirribonucleótidos trifosfatados

DPN – Diagnóstico pré-natal

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético

FDA – *Food and Drug Administration*

Fe II – Ferro ferroso

Fe III – Ferro férrico

fL – Fentolitros

G – Guanina

g – Grama

G6PD – Glucose-6-fosfato desidrogenase

HAP – Hipertensão arterial pulmonar

HbA – Hemoglobina A

HbA₂ – Hemoglobina A₂

HbC – Hemoglobina C

HbF – Hemoglobina fetal

HbS – Hemoglobina S (*Sickle hemoglobin*)

HbSC – Heterozigotia composta entre a HbS e HbC

HbSS – Homozigotia para a mutação *HBB*: c.20A>T

Hg – Mercúrio

HGM – Hemoglobina globular média

HIV1 – Vírus da imunodeficiência humana 1 (*human immunodeficiency vírus 1*)

HLA – Antígeno leucocitário humano (*human leukocyte antigen*)

HPLC – Cromatografia líquida de alta definição (*high performance liquid chromatography*)

HS – Locais hipersensíveis à DNase I (*DNase I hypersensitive site*)

HU – Hidroxiureia

HWE – Equilíbrio de Hardy-Weinberg (*Hardy-Weinberg equilibrium*)

ICAM-1 – Moléculas de adesão intercelular-1 (*Intercellular Adhesion Molecule 1*)

INSA – Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge

Kb – Kilobase

KDa – Kilodalton

L – Litro

LCR – *Locus control region*

LDH – Lactato desidrogenase

Leu – Leucina

MCS – Sequências conservadas em multiespécies (*Multispecies conserved sequences*)

MetHb – Metemoglobina

mg – Miligrama

mm – Milímetro

NAD – Nicotinamida adenina dinucleótideo

nm – Nanometro

ng – Nanograma

NO – Óxido nítrico

O₂ – Molécula de oxigénio

OH – Grupo hidroxilo

OMS – Organização mundial da saúde

pb – Par de bases

PCR – Reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction*)

PCR-RFLP – PCR - *restriction fragment length polymorphism*

Phe – Fenilalanina

PS – Fosfatidilserina

PSGL-1 – *P-selectin glycoprotein ligand-1*

PSR – Recetores específicos de fosfatidilserina

RDW – *Red cell distribution width*

RNA – Ácido ribonucleico

SCA – Anemia das células falciformes (*Sickle cell anemia*)

SCD – Doença das células falciformes (*Sickle cell disease*)

SNP – Polimorfismo de nucleótido único (*Single Nucleotide Polymorphism*)

T – Timina

TBE – Tris-borato-EDTA

TCTH – Transplante de células-tronco hematopoiéticas

U – Uracilo

UTI – Unidade de Tecnologia e Inovação

UV – Ultravioleta

Val – Valina

VGM – Volume globular médio

VLA-4 – *Very late antigen-4*

α – *Alpha*

δ – *Delta*

β – *Beta*

γ – *Gama*

ε – *Épsilon*

ζ – *Zeta*

μL – Microlitro

1 Introdução

1.1 O sangue, constituição e funções

O sangue é o tecido líquido responsável pelo transporte da “vida”. No humano adulto, 4 a 5 litros de sangue são movidos continuamente dos pulmões aos restantes tecidos através de uma rede complexa de vasos sanguíneos, permitindo que este entre em contacto com as diferentes células de cada órgão¹. A sua principal função passa pela entrega de nutrientes essenciais à diversidade celular existente no corpo humano. Outra função essencial do sangue é a distribuição do oxigénio (O₂), proveniente dos pulmões, a todo o organismo¹, sendo este o elemento mais básico essencial para a sobrevivência humana. Como troca, o sangue recolhe os resíduos celulares resultantes do metabolismo, como é o caso do dióxido de carbono (CO₂), e retorna-os aos pulmões¹.

O sangue é composto por uma matriz líquida denominada por plasma e por algumas linhagens de células especializadas destinadas a uma função específica¹. A formação das células do sangue (hematopoiese) ocorre no tecido hematopoiético e há essencialmente três tipos de células que constituem este tecido: eritrócitos ou glóbulos-vermelhos, glóbulos brancos (onde se incluem os neutrófilos, eosinófilos, basófilos, linfócitos e monócitos) e plaquetas (ou trombócitos)¹. Os linfócitos estão envolvidos na imunidade, enquanto que os macrófagos são responsáveis pela degradação e ingestão de microrganismos e corpos estranhos; as plaquetas contribuem para a formação dos coágulos sanguíneos; já os eritrócitos, tal como referido acima, têm a função de transportar o O₂ e o CO₂, bem como monóxido de carbono (CO) e óxido nítrico (NO)^{1,2}.

1.2 As hemoglobinas humanas – função, estrutura e ontogenia

Como mencionado, os eritrócitos são células especializadas para o cumprimento da sua função primária, o transporte de oxigénio^{1,2}. Os eritrócitos possuem em média um diâmetro de apenas 7,8µm, o que lhes confere a capacidade de se deslocarem por capilares sanguíneos extremamente estreitos, muitos dos quais com um diâmetro inferior ao dos próprios eritrócitos, o que obriga a que estas células sofram uma grande distorção¹. Por esta razão necessitam de uma grande flexibilidade que lhes permita posteriormente retomar a sua configuração original¹.

Devido às grandes necessidades de O_2 que o ser humano tem, os eritrócitos sofreram adaptações evolutivas destinadas a melhorar a sua eficiência na entrega deste elemento essencial¹. Uma das particularidades fundamentais desta adaptação é a ausência de núcleo; desta forma, o consumo de oxigênio para o metabolismo da própria célula transportadora é notavelmente reduzido, possibilitando uma maior entrega aos tecidos. No entanto, em virtude desta ausência, os eritrócitos apresentam um tempo de vida curto, que ronda os 120 dias¹. A forma bicôncava da célula evidencia mais uma das suas adaptações; esta característica confere uma maior relação superfície-volume que favorece as trocas gasosas¹. Ao contrário dos invertebrados, os animais mais complexos, como é o caso dos humanos, necessitam de grandes quantidades de O_2 . Por este motivo, os eritrócitos contêm grandes quantidades de um tipo de proteínas denominadas de “hemoglobina”, que são capazes de transportar quantidades relativamente grandes de O_2 ^{1,2}.

Assim, a hemoglobina é o conjunto de proteínas encarregues de transportar o O_2 nos eritrócitos^{1,3,4}.

Nos humanos, após o nascimento, a principal hemoglobina é a hemoglobina A (HbA). Esta foi uma das proteínas mais investigadas na década de 1950 e através dos avanços da cristalografia de raio-X foi possível a determinação das suas sequências de aminoácidos bem como os arranjos espaciais dos átomos, o que permitiu compreender a relação entre a estrutura molecular da hemoglobina e o seu funcionamento como transportador de O_2 , bem como o seu fenótipo normal^{2,5}. Uma molécula de hemoglobina perfeitamente constituída tem um peso molecular que varia entre os 64 e os 64,5 kDa e é formada por dois conjuntos de polipéptidos diferentes – as globinas – que juntos arquitetam uma estrutura quaternária (Fig. 1.1A)⁴.

Cada um dos polipéptidos contém no seu interior um átomo de ferro no estado ferroso (Fe II) envolvido no centro do anel da molécula de porfirina designada por grupo heme (Fig. 1.1B), este último, representando cerca de 4% do peso da hemoglobina^{1,4}. Cada molécula de hemoglobina comporta 4 átomos de ferro e cada um deles é capaz de estabelecer ligações com 2 átomos de oxigênio^{1,4}. Desta forma, o ferro encontrado no grupo prostético heme é encarregue de transportar o O_2 ; por sua vez, a estrutura complexa de porfirina juntamente com a globina fornecem o ambiente adequado para salvaguardar o ferro da oxidação tornando-o solúvel e promovendo a alteração da sua afinidade ao O_2 , uma vez que este tem a capacidade de reverter esta afinidade^{1,4}. Por outro lado, as cadeias

alfa da hemoglobina diminuem a afinidade com o O₂ devido ao processo reversível de carbonatação⁴. Este processo facilita a captação de CO₂ produzido durante os processos metabólicos do organismo⁴. A sua captação é ainda culminada pela grande capacidade que a hemoglobina não oxigenada (desoxi-hemoglobina) tem de transportar mais CO₂ que a hemoglobina oxigenada (oxihemoglobina); desta forma, após a libertação de O₂ nos tecidos, o CO₂ é eficazmente captado ⁴.

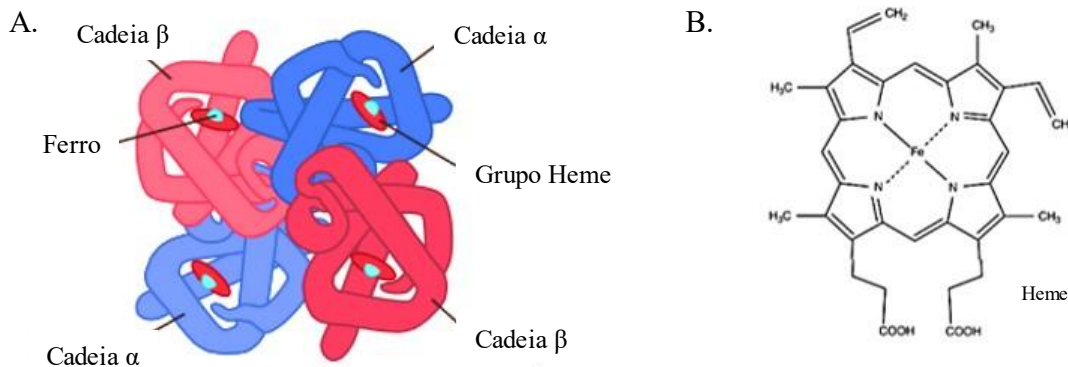


Figura 1.1. Representação da constituição da hemoglobina A. (A) Tetrâmero de hemoglobina A composto por duas cadeias α - e duas cadeias β -globina. Cada globina contém no seu interior um grupo prostético denominado heme. (B) Estrutura da molécula de porfirina em que se envolve o átomo de ferro (grupo heme). Adaptado de: Diepstraten and Hart, 2019⁶

A composição das hemoglobinas varia ao longo do estadió da vida (embrionário, fetal e adulto) num processo conhecido por “*globin switching*”, dando lugar a seis hemoglobinas diferentes (Fig. 1.2A) que respondem às mudanças de necessidade de oxigénio durante o desenvolvimento^{4,6}.

Cada hemoglobina tem uma estrutura tetramérica formada por duas globinas do tipo α [ζ (zeta) ou α (alfa)] e duas globinas do tipo β [ϵ (épsilon), γ (gama), δ (delta) ou β (beta)]⁴. A síntese é controlada por dois agrupamentos multigénicos; o agrupamento α -globínico, localizado no cromossoma 16 que contém os genes globínicos ζ -, $\alpha 2$ - e $\alpha 1$ -globina e o agrupamento β -globínico, presente no cromossoma 11 que compreende os genes ϵ -, γ -, δ - e β -globina ⁴. Os genes no agrupamento α - e β -globina apresentam a mesma disposição transcricional e estão dispostos na mesma ordem em que são expressos ao longo do desenvolvimento, acompanhando as mudanças temporais dos principais locais da eritropoiese (Fig. 1.2B)⁴. Assim sendo, ainda numa fase embrionária, no saco vitelino, formam-se os tetrâmeros $\zeta 2\gamma 2$, $\zeta 2\epsilon 2$ e $\alpha 2\epsilon 2$, correspondentes, respetivamente, às

hemoglobinas Portland, Gower I e Gower II^{4,5,7}. Estes permanecem constantes até que os elementos regulatórios impulsionem a expressão dos genes α e γ , cujas cadeias globínicas tetramerizadas constituem a hemoglobina fetal (HbF) $\alpha_2\gamma_2$ ⁸. No decorrer da fase fetal, o local da eritropoiese é alterado do saco vitelino para o fígado e baço. Após o nascimento, o principal órgão da eritropoiese passa a ser a medula óssea. Agora, a síntese da γ -globina por expressão dos genes *HBG1* (^A γ) e *HBG2* (^G γ) diminui gradualmente e, inversamente, aumenta a expressão do gene da β -globina (*HBB*). Assim, é promovida a formação do tetrâmero $\alpha_2\beta_2$, que constitui a principal hemoglobina presente na fase adulta, a HbA, que representa cerca de 97% da hemoglobina total^{5,8}. Em menores quantidades, é possível ainda verificar-se na fase adulta, a HbF em quantidades geralmente abaixo de 1%, e a hemoglobina A₂ (HbA₂; $\alpha_2\delta_2$) em quantidades na ordem de 2-3%^{5,9}.

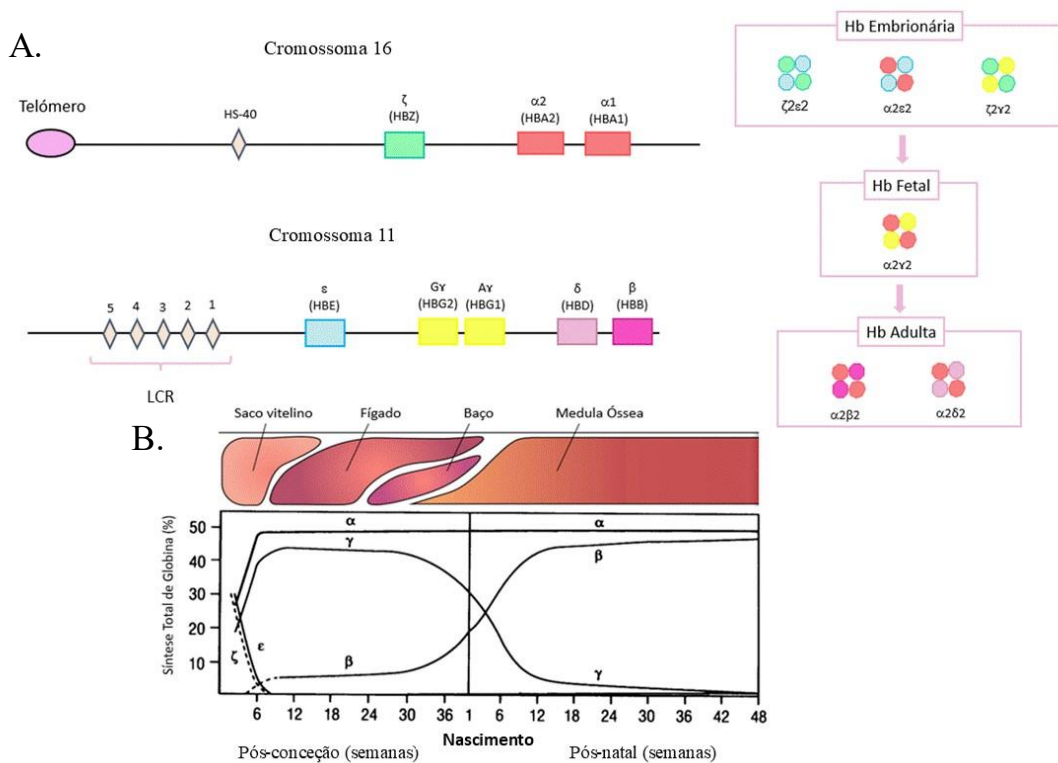


Figura 1.2. Ontogenia das hemoglobinas humanas. (A) Representação esquemática do agrupamento génico da α -globina, localizado no cromossoma 16, e do agrupamento génico da β -globina, localizado no cromossoma 11. Exibição das diferentes hemoglobinas ao longo do desenvolvimento com base na expressão dos genes dos agrupamentos. (B) Expressão das diferentes globinas ao longo do desenvolvimento. Os genes ζ e ϵ são expressos durante um curto espaço de tempo (período embrionário) até que a expressão dos genes α e γ as substitua (período fetal). Por fim, os genes α , β e δ dão origem às principais hemoglobinas da fase adulta (HbA e HbA₂). Adaptado de: Stamatoyannopoulos, 1992¹⁰; Higgs et al., 2005⁷; Lee et al., 2021¹¹; Zittersteijn et al., 2021¹²

A grande variedade de globinas durante o desenvolvimento despertou o interesse dos investigadores em compreender os processos e mecanismos biológicos que controlam a

expressão dos genes das globinas. Assim, foi descoberto que a expressão destes genes depende dos elementos regulatórios proximais (os promotores) para além de também depender de elementos regulatórios localizados a montante dos genes¹¹. Os elementos regulatórios distais da α -globina fazem notar-se a 30-70 kb a montante do respetivo agrupamento génico e compreendem quatro sequências conservadas em multiespécies (MCS), denominadas por MCS-R1, MCS-R2, MCS-R3 e MCS-R4, ou HS-1 a 4, e que são fundamentais para a expressão dos genes globínicos em *cis*¹¹. Do mesmo modo, a expressão dos genes do tipo β -globina é regulada por um conjunto de sequências situadas a montante desse agrupamento génico ao qual se atribuiu o nome de região de controlo do locus (LCR) e é constituída por cinco locais hipersensíveis à DNase I (HS-1, -2, -3, -4 e -5)¹¹. Através de estudos *in vitro* e *in vivo*, foi demonstrado que o LCR realiza interações com os promotores dos genes da β -globina e que na sua ausência manifesta-se numa redução acentuada de transcritos de globina. Apesar de ter havido muitos avanços no conhecimento desta regulação génica a longa distância, os mecanismos envolvidos continuam a ser objeto de estudo, uma vez que estes ainda não se encontram totalmente compreendidos^{11,13}.

1.3 As patologias relacionadas com a hemoglobina – as hemoglobinopatias

Sendo as hemoglobinas proteínas de extrema importância, as suas subunidades – as globinas - são altamente conservadas preservando-se oito regiões helicoidais de A a H⁴. Uma pequena alteração de um aminoácido pode ser o suficiente para comprometer toda a sua funcionalidade, levando ao desenvolvimento de patologias designadas por hemoglobinopatias^{2,4}. As patologias associadas aos genes das globinas apresentam uma transmissão autossómica recessiva^{14,15}. De um modo geral, as hemoglobinopatias são o resultado de mutações pontuais, de deleções, ou de inserções nos genes globínicos, ou, mais raramente, nas suas regiões regulatórias.

As hemoglobinopatias apresentam uma grande prevalência nos países europeus que rodeiam o Mediterrâneo, no Sudeste Asiático e em África, locais onde estas foram originalmente encontradas¹⁵⁻¹⁷. Devido aos múltiplos fenómenos migratórios, a dispersão tornou-se cada vez mais heterogénea no mundo ao ponto de serem classificadas como doenças endémicas em vários locais do globo¹⁵⁻¹⁷.

Com um impacto que atinge cerca de 7% da população mundial, as hemoglobinopatias são as doenças hereditárias de transmissão autossômica recessiva que mais afetam a população, estimando-se 300 000 - 400 000 de neonatos por ano¹⁵⁻¹⁷.

As hemoglobinopatias são classificadas de acordo com o tipo de consequência que a alteração nos genes pode desencadear, sendo discriminadas por defeitos quantitativos ou qualitativos^{15,18}. Os defeitos quantitativos definem-se por uma produção diminuída ou ausência total de uma das cadeias de globina, contudo, a sua produção é estruturalmente normal; já os defeitos qualitativos implicam uma alteração das propriedades estruturais de uma das subunidades de globina^{15,18}.

1.3.1 Defeitos quantitativos – Talassémias

Descrita por Cooley e Lee em 1925, a talassémia foi relatada pela primeira vez na região do Mediterrâneo. Por este motivo foi-lhe atribuído o nome que provém do grego: “talassa” que significa mar e “haema” que significa sangue. No entanto, como todas as hemoglobinopatias, a prevalência da talassémia é verificada hoje em diversas regiões^{1,19,20}.

A talassémia é um grupo heterogéneo de doenças hereditárias, de transmissão autossômica recessiva, cuja principal característica é a redução ou a total ausência da síntese das cadeias de globina^{9,11,18}. As alterações genéticas que dão origem às talassémias podem afetar as cadeias α -, β -, $\delta\beta$ -, $\gamma\delta\beta$ -, δ - ou γ -globina e são designadas de acordo com a cadeia que sofre a alteração¹¹. Até a data, desconhece-se distúrbios que envolvem a cadeia ϵ e são raros os existentes nas cadeias γ e δ , pelo que a predominância de alterações globínicas encontram-se localizadas nas cadeias α e β , originado, respetivamente, as α -talassémias e as β -talassémias¹.

Como suprarreferido, a hemoglobina é formada por duas cadeias do tipo α e duas do tipo β ; uma instabilidade nesta proporção gera um excesso da cadeia produzida na taxa normal. A cadeia em excesso é impossibilitada de emparelhar com a cadeia complementar, o que conseqüentemente leva à sua precipitação na célula e causa danos na membrana celular favorecendo a hemólise prematura dos eritrócitos ou até mesmo uma eritropoiese ineficaz, no caso dos danos ocorrerem nos seus precursores¹¹. Os acontecimentos em cadeia resultam numa anemia em que eritrócitos apresentam uma coloração menos acentuada (hipocrômica) e um tamanho reduzido (microcítico)^{15,21}.

1.3.1.1 A α -Talassémia

As deleções são alterações cromossómicas que provocam a perda de material genético; esta é a base mais comum que dá origem a α -talassémia, podendo estas deleções apresentarem extensões variáveis. As formas mais frequentes de α -talassémia são devidas às deleções de 3,7 kb e 4,2 kb^{3,4,11,22}.

Os genes da α -globina encontram-se duplicados em cada cromossoma 16 em duas unidades de 4 kb homólogas^{4,11,23,24}. A origem dos fenómenos deletionais mencionados previamente aparentam ocorrer pelo facto dos genes homólogos da α -globina se encontrarem em *tandem*⁴. As regiões homólogas do gene são divididas pelas caixas X, Y e Z (Figura 1.3A) e a distância verificada entre a primeira caixa Z e o seu homólogo é de 3,7 kb; já as caixas X estão separadas por 4,2 kb^{3,23,25}. O *crossing-over* desigual dos cromossomas homólogos durante a meiose origina um cromossoma com um único gene α e um cromossoma contendo o triplicado do gene da α -globina ($\alpha\alpha\alpha^{\text{anti}3,7}$ e $\alpha\alpha\alpha^{\text{anti}4,2}$), como é verificado na Figura 1.3A e 1.3B^{3,23,25}. O cruzamento entre as caixas Z dos cromossomas homólogos leva a uma deleção à direita (Figura 1.3A) em que 3,7 kb de DNA são doados de um cromossoma para outro; de modo idêntico, um cruzamento entre as caixas X exclui 4,2 kb de um dos cromossomas, originando uma deleção à esquerda (Figura 1.3B)^{3,23,25}.

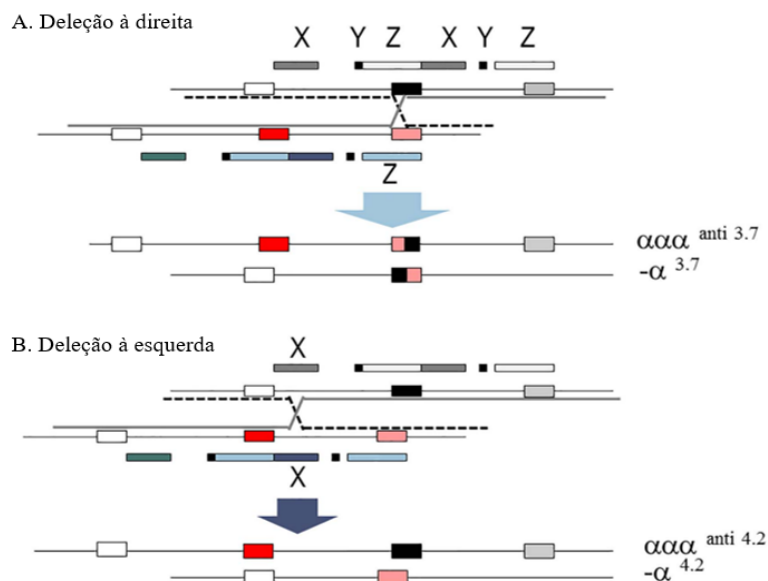


Figura 1.3. Representação esquemática do mecanismo que dá origem às deleções comuns da α -talassémia. (A) O emparelhamento normal dos genes da α -globina, com as regiões de homologia X, Y e Z e o *crossing-over* que gera a deleção $\alpha^{3.7}$. **(B)** O emparelhamento normal dos genes da α -globina, com as regiões de homologia X, Y e Z e o *crossing-over* que gera a deleção $\alpha^{4.2}$.

Adaptado de: Farashi & Harteveld, 2018²³

As α -talassémias podem apresentar diferentes fenótipos a nível clínico como consequência da dosagem génica em falta, levando ao aparecimento de essencialmente quatro manifestações clínicas cuja gravidade hematológica aumenta de maneira proporcional ao número de genes afetados. As lesões genéticas que interferem na produção de α -globina destabilizam a formação das hemoglobinas de expressão fetal e adulta, uma vez que os genes da alfa-globina são expressos desde a fase embrionária do desenvolvimento humano e conseqüentemente, a manifestação dessas lesões faz-se notar no período intrauterino e pós-natal⁴.

São considerados portadores silenciosos os indivíduos que apresentam a ausência de um dos quatro genes da α -globina ($-\alpha/\alpha\alpha$), estas alterações não manifestam transtornos hematológicos significativos, pelo que a anomalia destes indivíduos apenas é identificada após realização de teste genético pós-natal^{18,23}. Diferente dos portadores silenciosos, o estado de heterozigoto implica a perda de expressão de dois genes α -globina, dando origem a manifestações clínicas como anemia ligeira, hipocromia e microcitose¹⁴. A perda dos dois genes pode ser em *cis*, no mesmo cromossoma ($\alpha\alpha/--$) ou em *trans*, envolvendo os cromossomas homólogos ($\alpha/-\alpha$). Ambas as deleções dão origem ao mesmo fenótipo, sendo a primeira mais comum no Sudeste Asiático⁴. A deleção dos três genes da α -globina ($--/\alpha$) dá origem a características como anemia moderada a grave devido à precipitação gradual da Hb H no eritrócito em circulação^{3,4,14}. A limitação

acentuada de cadeias α -globina origina um excesso de globinas do tipo β livres para formar uma hemoglobina homotetramérica⁴. A hemoglobina composta por γ_4 é conhecida como Hb Bart's, e o tetrâmero β_4 é denominado por Hb H⁴. Qualquer uma das hemoglobinas homotetraméricas mencionadas são ineficientes como transportadoras de oxigênio uma vez que são incapazes de libertar oxigênio para os tecidos⁴. Os descendentes de dois portadores do alelo $--/\alpha\alpha$, podem receber cromossomas com a deleção dos quatro genes α ($---/---$)⁴. Como consequência, os níveis de Hb Bart's são elevados causando hipoxia intrauterina grave e os indivíduos nascem com uma acumulação generalizada de líquido, que pode resultar na morte *in utero* ou após o nascimento, condição essa denominada hidropsia fetal. Este facto acontece com alguma frequência no Sudeste Asiático por aqui serem prevalentes grandes deleções no agrupamento génico da α -globina que removem os dois genes α -globina do mesmo alelo^{3,4,14}.

Mais raramente a α -talassémia é devida a mutações pontuais que podem ocorrer em qualquer dos genes α -globina. Contudo, dois terços da produção da globina total é da responsabilidade do gene α_2 , pelo que as mutações do gene α_2 apresentam efeitos mais nefastos do que as mutações do gene α_1 ²².

1.3.1.2 A β -Talassémia

Diferente da α -talassémia que tem por base sobretudo deleções, a β -talassémia geralmente provém de substituições de um único par de bases que tenha como consequência a diminuição da expressão do gene *HBB*. Assim, a síntese da cadeia β -globina é diminuída, causando anemia hipocrômica e microcítica. As cadeias α -globínicas em excesso são insolúveis e precipitam, originando uma eritropoiese pouco eficiente e hemólise devido aos danos na membrana dos eritroblastos²¹. Até cerca dos seis meses após o nascimento, a produção de β -globina encontra-se naturalmente diminuída, razão pela qual a manifestação de β -talassémia apenas ocorre após esse período, quando a β -globina deverá substituir a γ -globina, e assim a HbA deverá substituir a HbF^{9,21}.

São inúmeras as mutações β -talassémicas e por este motivo, pessoas afetadas por duas mutações talassémicas nem sempre são homozigóticas, uma vez que podem ter mutações talassémicas diferentes, e nesse caso denominam-se compostos heterozigóticos^{11,21}. Indivíduos com dois alelos afetados com mutações graves têm, geralmente, a doença na

sua forma mais grave, a talassémia major, o que origina anemia muito grave que requer transfusões sanguíneas regulares e quelação do ferro²¹. Nos casos de gravidade intermédia, onde as transfusões não são requeridas regularmente, a talassémia denomina-se intermédia. Por outro lado, o indivíduo portador (apenas com um alelo afetado) não é doente e considera-se que tem uma talassémia minor ou traço talassémico^{11,21}.

Os casos de β -talassémia são distinguidos, em termos bioquímicos, em três categorias: (i) se a produção de β -globina for nula (β^0); (ii) caso seja produzida em baixa quantidade (β^+); (iii) na hipótese de ser minimamente reduzida é então denominada de minor (β^{++})^{11,21}.

1.3.2 Defeitos qualitativos – Variantes da Hemoglobina

As hemoglobinopatias do tipo qualitativo são essencialmente caracterizadas pela alteração estrutural da molécula de hemoglobina¹⁵. São, geralmente, causadas por alterações pontuais na região codificante dos genes da β -globina ou da α -globina (mutações *missense*) que originam a alteração de um aminoácido na globina correspondente. Essa alteração na estrutura da hemoglobina pode conferir-lhe propriedades físico-químicas muito diversas e pode, ou não, originar doença.

De entre as variantes de hemoglobina conhecidas, a variante patogénica mais frequente é causada pela alteração c.20A>T no gene da β -globina, rs334, que origina a variante de hemoglobina denominada de hemoglobina S (HbS).

A doença das células falciformes (SCD) é um termo generalizado para descrever um tipo de hemoglobinopatias em que ambos os genes da β -globina se encontram afetados e em que pelo menos um deles apresenta a mutação que origina a HbS^{26,27}. Este grupo engloba a homozigotia para a mutação c.20A>T (HbSS), conhecida como anemia das células falciformes (SCA) ou drepanocitose. Para além disso, engloba também os casos de heterozigotia composta entre uma variante estrutural da hemoglobina (como por exemplo a HbC) ou uma mutação β -talassémica, em *trans* com a mutação c.20A>T^{26,27}. Das formas apresentadas da SCD, em indivíduos de ascendência africana, a drepanocitose é a causa mais comum, afetando cerca de 65-70% dos casos de SCD; seguindo-se a HbSC, que atinge cerca de 30% dos casos e por fim a mais rara, a HbS/ β -talassémia²⁶.

Tratando-se a drepanocitose da forma mais frequente e severa da SCD, é também, consequentemente, a mais investigada, bem como a condição descrita de maneira mais pormenorizada²⁶.

1.4 A Drepanocitose

Em 1910, James Herrick descreveu formalmente e pela primeira vez o fenótipo dos eritrócitos peculiares da anemia falciforme como “alongadas e em forma de foice” (Fig. 1.4)²⁸. A base por detrás da deformação relatada por Herrick foi elucidada em 1957 quando Ingram demonstrou pela primeira vez como a alteração de um aminoácido consegue ter um efeito impactante, alterando a proteína onde se encontra^{26,29}. Goldstein et al. comprovaram que a substituição de apenas um único nucleótido, c.20A>T no gene da β -globina (*HBB*) no cromossoma 11, resulta numa mutação *missense* que provoca a alteração do 6º aminoácido da cadeia de β -globina, de ácido glutâmico para valina. Consequentemente, há a alteração de um aminoácido de carga neutra, observado na hemoglobina normal, para um resíduo hidrofóbico que torna a proteína menos eficiente que o normal³⁰. Para além disso, esta proteína anómala ganha a propriedade de falciformizar em condições de baixa de oxigénio.

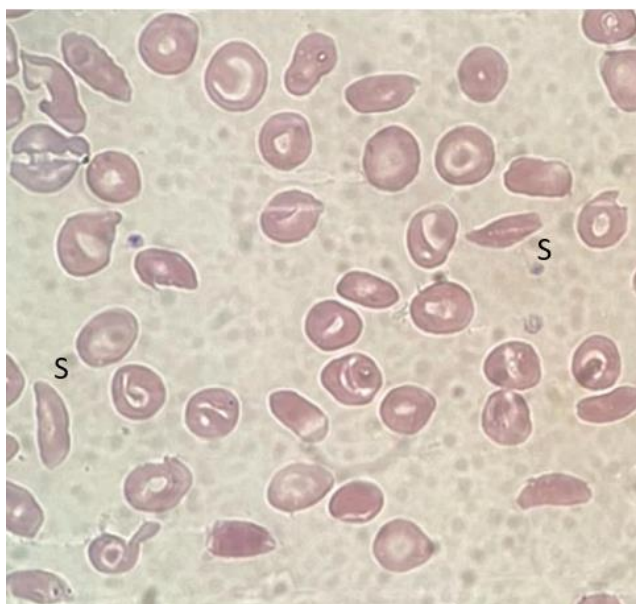


Figura 1.4. Esfregaço de sangue periférico de um indivíduo com drepanocitose. Na imagem é possível verificar as alterações da morfologia dos eritrócitos falciformes (marcados com S). É também possível observar várias células em alvo (*target cells*). Adaptado de: O'Brien et al., 2022³¹

A drepanocitose é uma doença de herança monogénica autossómica recessiva, como tal, indivíduos portadores do traço drepanocítico (heterozigotos) apresentam apenas uma cópia do alelo que origina a HbS e uma outra cópia correspondente à HbA, esta dualidade impede a manifestação da patologia. Ao contrário, nos doentes drepanocíticos, verifica-se duas cópias dos alelos com a mutação drepanocítica, originando-se HbS e ausência de HbA.

O alelo β^S é classicamente associado a cinco haplótipos que se caracterizam por um padrão de regiões polimórficas ao longo do agrupamento génico de β -globina onde o alelo β^S se encontra inserido. Esses haplótipos foram denominados: Árabe-Indiano, Benim, Camarões, Bantu (ou África Central) e Senegal, com base nos grupos etnolinguísticos ou regiões geográficas correspondentes, contudo as designações não indicam necessariamente onde os haplótipos se originaram^{32,33}. É ainda integrado uma sexta categoria para haplótipos que não seguem nenhum destes padrões, os chamados "atípicos"³³. Os haplótipos foram definidos de acordo com a presença ou ausência de um conjunto de locais de restrição canónicos de polimorfismos conservados ao longo do agrupamento β -globínico, sendo os principais locais de restrição: 5' - *Xmn* I ($^G\gamma$), *Hind* III ($^G\gamma$ e $^A\gamma$), *Hinc* II (5' $\psi\beta$ e 3' $\psi\beta$) e *Hinf* I (β) - 3'^{32,33}.

Tabela 1.1 Principais haplótipos associados à drepanocitose

Haplótipo	<i>Xmn</i> I ($^G\gamma$)	<i>Hind</i> III ($^G\gamma$)	<i>Hind</i> III ($^A\gamma$)	<i>Hinc</i> II (5' $\Psi\beta$)	<i>Hinc</i> II (3' $\Psi\beta$)	<i>Hinf</i> I (3' β)
Senegal	+	+	-	+	+	+
Benim	-	-	-	-	+	+
Bantu	-	+	-	-	-	+
Camarões	-	+	+	-	+	-
Arabo-indiano	+	+	-	+	+	-

1.4.1 Distribuição geográfica

A drepanocitose é uma doença que tem vindo a ganhar cada vez mais importância devido ao seu impacto crescente a nível mundial. A origem desta patologia é ainda uma incógnita; análises genéticas vieram demonstrar que o evento mutacional rs334 surgiu

por meio de ocorrências independentes que se deram sobre cada um dos haplótipos em diferentes populações (quatro vezes em África em regiões Bantu, Benim, Senegal e Camarões e uma vez na Índia) e estes preservaram-se devido à seleção natural³³⁻³⁵. Em contraste, estudos mais recentes trouxeram novas evidências que levam a crer que o evento ocorreu uma única vez com possível origem na África Equatorial ou Médio Oriente³³. No presente, entre as regiões mais afetadas encontra-se a África subsaariana, regiões banhadas pelo Mediterrâneo, Médio Oriente e a Índia^{26,33}. Esta elevada prevalência é coincidente com regiões endêmicas de malária causada pelo *Plasmodium falciparum*. uma vez que a heterozigotia para HbS demonstra um elevado grau de proteção contra a malária, diminuindo o risco de malária grave em 86% por meio de mecanismos ainda pouco elucidados²⁶.

Dia 19 de junho assinala-se o Dia Mundial da Doença das Células Falciformes como forma de consciencialização da gravidade da doença, uma vez que apesar das vantagens protetoras do heterozigoto, acima referidas, a drepanocitose é um problema de saúde pública^{26,36}. A doença tem vindo a ganhar uma vasta dispersão geográfica, afetando áreas para além de suas origens geográficas iniciais, como é o caso da Europa e da América, devido às migrações populacionais recentes^{16,26,36}. O número real de indivíduos com SCD é ainda incerto, contudo, é notório que devido ao aumento populacional assim como à diminuição da taxa de mortalidade infantil, este valor tem vindo a aumentar³⁷. Modelos recentes conduziram a estimativas que indicam uma incidência mundial próxima de 300.000 neonatos com alelos de hemoglobina falciforme por ano, e que poderá atingir os 400.000 anuais até 2050³⁷. Sobretudo no continente Africano, a falta de diagnóstico e tratamento precoce poderá atingir de modo fatal cerca de 80% das crianças com o genótipo HbSS antes dos 5 anos de idade³⁷. As informações referentes à taxa de morbidade e mortalidade são limitadas, no entanto um estudo efetuado no Quênia veio divulgar uma taxa de mortalidade de 58/1000 por ano; valor este 23 vezes superior ao de crianças desprovidas de doença falciforme³⁷.

1.4.2 Fisiopatologia

Retratar a drepanocitose é inevitavelmente mencionar as crises de dor vaso-oclusivas, uma vez que esta é a característica fortemente marcada pela patologia. Apesar destas serem a principal manifestação, a premissa por detrás advém da ocorrência da polimerização da HbS³⁸. A polimerização da HbS dá-se sobretudo em baixas

concentrações de oxigénio, estimulando a alteração da estrutura dos eritrócitos bem como a sua função, resultando na morfologia observada por Herrick^{26,38}.

A polimerização da HbS ocorre devido ao local hidrofóbico causado pela substituição da valina na 6ª posição da cadeia da β -globina. Em desoxigenação, a β Val6 de uma cadeia β S de uma molécula de hemoglobina liga-se aos resíduos β Ala70, β Phe85 e β Leu88 de outra molécula de hemoglobina. Esta interação entre as desoxi-hemoglobinas S (desoxiHbS) é a necessária para a formação dos polímeros, onde 14 filamentos organizados de forma helicoidal (Fig. 1.5.) são necessários para distorcer e alongar os eritrócitos^{38,39}.

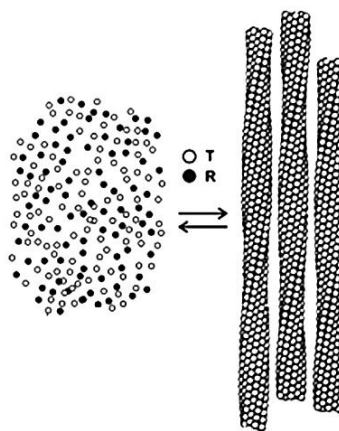


Figura 1.5. Representação esquemática da polimerização da HbS. As HbS desoxigenadas (conformação T) organizam-se formando polímeros de 14 fibras helicoidais que deformam e alongam os eritrócitos. Na representação é possível verificar que a HbS saturada com oxigénio (conformação R) não tem participação para a formação dos polímeros. Adaptado de: Eaton, 2020⁴⁰

Após a desoxigenação, as moléculas de hemoglobina colidem formando rapidamente um polímero de fibras multifilamentadas que enrijecem as células e alteram a forma bicôncava dos eritrócitos para foices alongadas – os drepanócitos (Fig. 1.6.)^{18,41,42}.

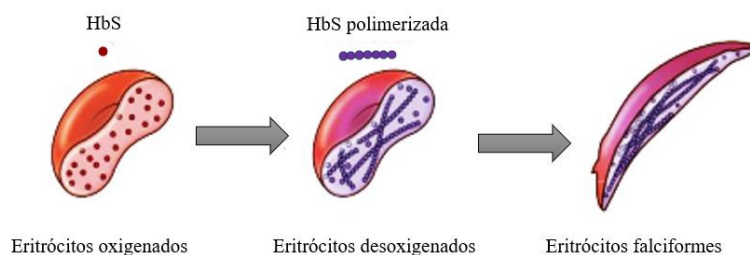


Figura 1.6. Representação esquemática da morfologia dos eritrócitos falciformes. A polimerização da desoxi-HbS conduz à alteração da estrutura e origina os eritrócitos tipicamente falciformes. Adaptado de: Williams & Thein, 2018²⁶

A reoxigenação permite quebrar o polímero e deste modo reverter a estrutura original do eritrócito; ainda assim, as consequências dos ciclos repetidos de falciformização e desfalciformização podem ser nefastas já que a membrana celular sofre danos que atuam na sua permeabilidade e provocam desidratação celular, repercutindo numa hemólise prematura e anemia hemolítica crónica^{18,42}.

A obstrução dos vasos sanguíneos, também denominada como vaso-oclusão é a principal ocorrência que leva à hipoxemia local com subsequente lesão tecidual direta e inflamação^{43,44}. Dado a morfologia alterada dos eritrócitos falciformes, é intuitivo responsabilizá-los pela vaso-oclusão. De facto, assumir-se que a causa raiz do bloqueio vascular provém apenas da polimerização da hemoglobina é nos dias de hoje uma explicação excessivamente simplista⁴⁵.

O fluxo sanguíneo é ditado por vários fatores e componentes presentes no sangue. De entre os principais ressalta-se a expressão de moléculas de adesão na superfície celular que favorecem a adesão intercelular e adesão das células sanguíneas ao endotélio^{43,46,47}. Os eritrócitos falciformes expressam à sua superfície uma elevada quantidade de fosfatidilserina (PS); complementarmente, nas células endoteliais verifica-se a presença de recetores específicos de fosfatidilserina (PSR) que permitem a adesão entre estes eritrócitos e o endotélio^{43,47}. Durante as crises drepanocíticas, a expressão de PS é intensificada desencadeando uma maior interação entre eritrócitos e endotélio. Além disso, as moléculas de adesão aprisionam as plaquetas contribuindo deste modo também para o bloqueio dos vasos⁴⁷.

O gás natural NO, reconhecido como um neurotransmissor gasoso, tem também um papel crucial na prevenção da vaso-oclusão uma vez que este dificulta a ligação das moléculas de adesão, ajuda a manter os níveis de plaquetas estáveis e tem uma ação vasodilatadora. Ao contrário dos eritrócitos morfologicamente normais, que têm um tempo de vida estimado em 120 dias, os eritrócitos falciformes são demasiado frágeis e a sua vida dura em torno dos 10-20 dias^{47,48}. A lise celular resultante dessa fragilidade liberta o heme existente no interior das células que por sua vez reduz a biodisponibilidade de NO, conduz à expressão de moléculas de adesão e à produção de péptidos que conferem constrição dos vasos sanguíneos (endotelina)^{42,47,48}. A depleção de NO favorece ainda o aumento plaquetário (trombocitose)⁴⁸. As plaquetas libertam micropartículas, moléculas de adesão intercelular-1 (ICAM-1) solúveis, bem como selectinas E e P, estas últimas com capacidade para favorecer a adesão dos leucócitos ao endotélio^{43,48}.

Em acréscimo, em resposta à hemólise descomedida, a medula óssea sofre reticulocitose de stress^{41,43}. O que significa que são libertadas para a corrente sanguínea maior quantidade de reticulócitos. Estas células imaturas apresentam um elevado número de moléculas de adesão, como por exemplo, a ICAM-1, *very late antigen-4* (VLA-4) ($\alpha 4\beta 1$) e *cluster of differentiation 36* (CD36), permitindo uma maior facilidade de ligação destas ao endotélio^{43,46}.

Além de todos os critérios já referidos, é de salientar que em indivíduos com drepanocitose, o número basal de leucócitos é elevado e encontra-se associado ao aumento da morbidade e mortalidade, sugerindo que os neutrófilos têm um papel importante na vaso-oclusão tendo sido referido que aderem ao endotélio e capturam os eritrócitos falciformes, promovendo a vaso-oclusão^{26,42}.

Assim, e em resumo, a vaso-oclusão poderá ser desencadeada por estímulos inflamatórios ou ambientais, como em casos de hipoxia, infeção, desidratação ou outras causas não identificadas que podem diferir temporalmente no indivíduo ou entre os indivíduos^{41,43}.

1.4.3 Manifestações clínicas

As manifestações clínicas da drepanocitose são muito variáveis intra- e inter-indivíduos. Como referido anteriormente, uma característica comum são as crises vaso-oclusivas, cuja intensidade e frequência é também variável. Daqui advêm uma série de eventos, como episódios de dor, anemia hemolítica crónica, inflamação crónica, dano progressivo em vários órgãos, entre outros, pelo que a patologia é considerada uma doença multi-sistémica. Contudo, o curso da doença é variável e o contexto que determina o impacto nos diversos órgãos permanece, em parte, desconhecido^{26,41,44}.

1.4.3.1 Dor

Os processos da vaso-oclusão referidos anteriormente têm como consequência a hipoxia e esta, por sua vez, favorece o dano dos tecidos e inflamação por lesão de isquemia, resultando na dor excruciante característica da anemia falciforme⁴⁹. Os primeiros sintomas de dor na anemia falciforme podem iniciar-se entre os 3 e os 6 meses como um episódio de dactilite⁴⁹. A dor persiste durante toda a vida com uma frequência variável e é o principal motivo de internação hospitalar para adultos e crianças, sendo

mais frequente em adolescentes e jovens adultos do que em crianças pequenas^{44,49}. De modo geral, a dor é a complicação mais importante da doença e o aumento da frequência das crises de dor está relacionada com a morte precoce de indivíduos drepanocíticos⁴⁴.

A dor originada pela drepanocitose pode ser definida como aguda, crônica, neuropática, induzida por comorbilidades ou uma combinação destas⁴⁹.

Apesar das crises de dor serem o principal motivo de hospitalização, a maioria dos episódios de dores agudas são tratados em casa. Fatores como a idade e o sexo podem despoletar taxas crescentes de crises, como é verificado com o início do ciclo menstrual em muitas mulheres. Estímulos como exposição ao frio, infecções, desidratação, gravidez, ansiedade e stresse mental podem também contribuir como precursores⁴⁹.

As crises de dor podem ocorrer em qualquer parte do corpo, contudo, é mais comum afetarem extremidades de ossos longos, tórax/costas e pelve. Nos homens, o priapismo ou ereção dolorosa na ausência de estimulação sexual é uma causa de morbidade significativa⁴⁹.

A gestão da dor é um fator importante que valoriza a sobrevivência dos indivíduos com drepanocitose, no entanto, alguns eventos de dores são complexos e os tratamentos não correspondem às expectativas⁴⁹. Deste modo, é recomendado a elaboração de protocolos individuais tanto para pacientes no ambulatório como para pacientes internados, procedimento este que permite melhorar a qualidade de vida e diminuir a taxa de admissão hospitalar⁴⁹. O procedimento domiciliar inclui analgésicos orais, hidratação e repouso⁴⁹. No caso deste se tornar ineficaz, a triagem rápida e administração de opioides é recomendada⁴⁹. O primeiro passo para a avaliação, consiste em estimar a dor, geralmente auto-referida, com base numa escala de gravidade; de seguida, a administração de opióides. Os opioides impedem a transmissão dos estímulos da dor que conduzem a um aumento do limiar da dor⁴⁹. Um dos analgésicos mais utilizados para o controlo da dor é a morfina, que apesar da sua eficácia, é observado que em alguns pacientes, esta poderá originar retinopatia, lesão pulmonar aguda e acidente vascular cerebral⁵⁰. Deste modo, as alternativas aos opioides têm vindo a ser cada vez mais exploradas como é o caso da cannabis vaporizada, da arginina e da acupuntura⁵⁰.

1.4.3.2 Anemia hemolítica crónica e as crises de anemia aguda

Os doentes com drepanocitose têm uma anemia hemolítica crónica devido ao processo contínuo de destruição dos seus eritrócitos anómalos. Para além disso têm episódios de anemia aguda que é verificada quando existe um declínio da hemoglobina de no mínimo 2 g/dL dos valores habituais do indivíduo²⁶. Esta complicação é frequente durante as crises de dor, mas também é verificada durante a crise aplástica (ausência temporária de eritropoiese), hemólise exacerbada, sequestro esplénico agudo ou durante infeções agudas graves^{26,42}. Estima-se que mais de metade dos indivíduos com drepanocitose vivenciará um evento anémico agudo, podendo este ser fatal. Nestes contextos, é indicada a administração de uma transfusão de sangue⁴¹.

1.4.3.3 Dactilite

Uma das manifestações clínicas mais prematuras na drepanocitose é a dactilite^{26,51}. Este evento ocorre em bebés e crianças no momento em que se inicia a transição da HbF para a HbS^{41,51}. A inflamação do periósteo metacarpal devido ao enfarte da medula óssea, causa um inchaço doloroso das mãos e dos pés que duram de horas a muitos dias^{26,41}. O acontecimento dá-se sem um impulsionador e com pouco aviso prévio. Estes episódios dolorosos podem ser acompanhados por febre baixa e aumento de leucocitose que poderá ser um indicativo de infeção ou extenso dano tecidular⁴¹.

1.4.3.4 Úlceras nas pernas

As úlceras nas pernas são uma das muitas complicações associadas à doença, sendo que 5 a 10% dos doentes com idade superior a 10 anos apresenta esta lesão tecidular⁴¹. O *shunt* arteriovenoso impede a pele de receber oxigénio e esta privação origina as úlceras que afetam principalmente as zonas com menos gordura subcutânea ou zonas com pele fina e é maioritariamente observado em pacientes com maior taxa de hemólise⁵⁰. A base do tratamento é feita através do controlo da inflamação e da certificação de uma higienização adequada, de modo a reduzir os riscos de infeção. Como as dores podem ser imensuráveis, o uso de opioides é referido para o alívio⁴¹.

1.4.3.5 Osteonecrose e doenças ósseas

Cerca de metade dos indivíduos com drepanocitose são afetados com osteonecrose das articulações do quadril e do ombro⁴¹. A necrose isquêmica do osso afeta 25% a 50% dos adultos em resposta à vaso-oclusão, hipoxia tecidual e subsequente osteonecrose localizada^{41,48}. A evolução da complicação é progressiva e para a maioria dos doentes, dois anos após o início de sintomas é o suficiente para cabeça femoral entrar em colapso. Através da ressonância magnética é possível confirmar que a dor na articulação afetada, e os espasmos musculares derivam de uma osteonecrose⁴¹. O tratamento passa por fisioterapia de reabilitação, administração de anti-inflamatórios não esteroides e analgésicos; em casos extremos, a substituição total do quadril é necessária^{41,42}.

1.4.3.6 Auto-esplenismo e infecções

O baço é essencial na resposta imunitária. A sua função é equiparada a um filtro fagocítico capaz de remover células velhas e/ou danificadas, bem como microrganismos presentes no sangue; além disso, este também tem a incumbência de produzir anticorpos⁵². Nos doentes drepanocíticos, o baço tem, desde tenra idade, uma função desmesurada na eliminação das células sanguíneas anômalas. Esta função leva, inicialmente, a um aumento do seu tamanho (hiper-esplenismo). Contudo, como consequência de múltiplos bloqueios origina-se fibrose e a esclerose contínua dos tecidos do baço origina-se hipo-esplenismo. O baço atrofiado assemelha-se a uma “autoesplenectomia” onde o órgão se reduz e o indivíduo torna-se esplênico^{41,48,52}.

Devido ao mau funcionamento do baço, ou à ausência deste, os indivíduos com drepanocitose carecem de linfócitos B e, portanto, a resposta imunitária eficiente é prejudicada. Esta situação pode facilmente contribuir para um aumento do risco de infecções e mesmo de sepsis^{51,52}.

Embora ainda hoje se associe as infecções bacterianas a uma das principais causas de morbidade e mortalidade na drepanocitose foi verificado um progresso substancial no prognóstico após a introdução da penicilina como tratamento profilático^{42,44,51}. Um acréscimo à proteção de indivíduos com drepanocitose foi também o aparecimento da primeira vacina conjugada que confere imunização contra *Streptococcus pneumoniae* e *Haemophilus influenzae* que diminuiu significativamente a incidência dessas infecções^{42,44,51}.

1.4.3.7 Síndrome torácica aguda

A síndrome torácica aguda é a segunda causa mais frequente de hospitalização e uma das principais causas de morte na drepanocitose^{41,42,51}. Esta, é uma lesão pulmonar aguda derivada de um processo hiper-inflamatório que poderá ser fatal. É manifestada através de dor no peito, febre, tosse, hipoxia, sibilos e infiltrados pulmonares; progredindo em contexto de um episódio vaso-oclusivo^{41,43,51,53}. Esta complicação pode, por muitas vezes, ser nublada e indistinguível da pneumonia devido ao quadro clínico e aos exames radiológicos. Contudo, diferente da pneumonia, esta é resultado da patologia intrínseca da doença falciforme. Certamente, a presença de agentes microbianos, como *Streptococcus pneumoniae*, pode funcionar como promotor no desenvolvimento da lesão, no entanto, a síndrome torácica aguda é resultado da interação entre o agente infeccioso e a vulnerabilidade do hospedeiro⁴³.

É observado que a incidência desta lesão é maior em crianças, mas a sua gravidade é proporcional ao aumento da idade, resultando em morte ou complicações graves em 10% dos indivíduos adultos; sendo presumível que o aumento da gravidade esteja relacionado com uma maior incidência de êmbolos na medula óssea ou de gordura^{41,42,48}.

É pouco frequente que a gestão do tratamento seja direcionada ao motivo que o desencadeou, uma vez que raramente o motivo é evidente. Deste modo, as linhas de tratamento são generalizadas, alterando-se consoante o estado de desconforto respiratório, hipoxia e resultados laboratoriais⁴¹. Geralmente, é indicado antibióticos de largo espectro (mesmo na ausência de infeção documentada), broncodilatadores, espirometria de incentivo e motorização constante da saturação de oxigénio no sangue; em casos de hipoxia é indicado o uso de oxigénio suplementar⁴¹. O uso de analgésicos opioides, que é frequentemente utilizado, deve ser administrado com precaução devido ao seu efeito colateral que desencadeia depressão respiratória e aumento da hipoxia. A transfusão de sangue é muitas vezes sugerida, uma vez que permite repor os parâmetros hematológicos⁴¹.

A síndrome torácica aguda pode evoluir rapidamente, e apresentar uma extensa opacificação pulmonar com derrame, edema e falência de outros órgãos. Nestes casos, os recursos de intubação e suporte de ventilação mecânica é crucial^{41,51}.

1.4.3.8 Priapismo

O priapismo é o nome clínico atribuído à ereção indesejada e dolorosa do pênis²⁶. Cerca de 35% a 40% dos homens com drepanocitose são afetados com esta condição^{41,48}. Os eventos recorrentes são normalmente iniciados durante a noite e podem ter uma duração variável de, no mínimo, duas horas de desconforto tolerável, sendo estes episódios chamados de priapismo *stuttering*^{26,41}. Os episódios mais graves de priapismos são marcados por dores extremamente agonizantes que podem ser suportadas pelos pacientes durante dias, tendo muitas vezes como consequência a disfunção erétil permanente^{41,48}. Indivíduos com drepanocitose desenvolvem esta condição devido à vasculopatia derivada da hemólise e da alteração dos parâmetros hematológicos, e é constatado que nesses indivíduos, o risco de desenvolverem hipertensão pulmonar, acidente vascular cerebral, insuficiência renal e úlceras nas pernas é superior à dos indivíduos que não experienciam o priapismo^{41,54}.

1.4.3.9 Hipertensão pulmonar

A hipertensão arterial pulmonar (HAP) é uma condição reconhecida pela alteração da vasculatura pulmonar e pelo aumento da sobrecarga vascular pulmonar que tem como resultado insuficiência do ventrículo direito e hipertrofia⁵⁵. É descrita como uma pressão média pulmonar maior ou igual a 25 mm Hg em estado de repouso, enquanto que a pressão média normal da artéria pulmonar é 20 mm Hg⁵⁶. A HAP da drepanocitose enquadra-se na classificação de categoria cinco que agrupa a “hipertensão pulmonar com etiologias pouco claras ou múltiplas”, uma vez que os processos que podem resultar em HAP na doença falciforme são multifatoriais. No entanto, destes fazem parte o processo hemolítico, a baixa biodisponibilidade de NO e a hipoxia crónica^{41,56,57}.

Estima-se que 30 a 40% dos doentes adultos com drepanocitose, principalmente com idade superior a 35 anos, sejam diagnosticados com HAP, e que cerca de metade destes morre nos dois anos seguintes após o diagnóstico. As observações em autópsias demonstram uma frequência superior, confirmando que muitas vezes a vasculopatia pulmonar é assintomática ou não reconhecida⁴¹. A fim de se reduzir a mortalidade, pacientes com drepanocitose devem realizar rastreios para a presença de HAP⁴¹.

1.4.3.10 Acidente vascular cerebral

O acidente vascular cerebral (AVC) é uma complicação preocupante na drepanocitose que pode incluir eventos isquêmicos e hemorrágicos devido a oclusão de grandes vasos⁴¹. O fluxo sanguíneo cerebral é elevado em pacientes com drepanócitos, por outro lado, a hemólise dos eritrócitos reduz a disponibilidade de NO, lesionando o endotélio e favorecendo os danos nos vasos cerebrais⁴¹. Crianças drepanocíticas têm um risco 300 vezes maior de experimentar um AVC que as crianças sem drepanocitose e, aos 45 anos, um quarto dos adultos com drepanocitose apresenta um histórico de AVC^{42,48}.

O AVC isquêmico é causado quando ocorre a obstrução de uma artéria de grande calibre, geralmente, é acompanhado de uma complicação da síndrome torácica aguda⁴². Durante um AVC isquêmico podem ocorrer convulsões, ataque isquêmico transitório, fraqueza súbita, parestesia, afasia, disfasia, alterações do estado mental ou perda de consciência^{42,51}. Neste caso, é indicado uma avaliação imediata através de uma ressonância magnética e transfusões de troca rápida⁴².

Cerca de 3 a 30% das lesões neurológicas agudas devem-se ao AVC hemorrágico (ou hemorragia intracraniana) e têm uma mortalidade de 25 a 50%. Os indícios do episódio são sobretudo cefaleia intensa ou perda de consciência sem hemiparesia. Os estudos de imagem cerebral permitem confirmar a presença deste episódio⁴².

Os enfartes cerebrais silenciosos são lesões que não apresentam sintomas neurológicos, no entanto, comprometem a função neuro-cognitiva e traduzem-se no comportamento anômalo de alguns pacientes. Estas lesões são identificadas por meio de estudos de imagem cerebral e estão associadas a um risco elevado de AVC evidente^{41,51}.

1.4.3.11 Complicações cardiovasculares

Os indivíduos com drepanocitose geralmente apresentam uma pressão arterial normal, porém, os exames cardiológicos demonstram um aumento do coração, precórdio hiperativo e sopros sistólicos⁴¹. Cerca de 13% dos adultos com doença falciforme desenvolve cardiopatia do lado esquerdo causado principalmente pela disfunção diastólica. A combinação da doença vascular pulmonar e disfunção diastólica, verificado em diversos pacientes com doença falciforme, apontam um risco particularmente elevado de morte⁴⁴.

A síndrome torácica aguda, frequentemente verificada na drepanocitose, é relatada aos pacientes como um “ataque cardíaco”. No entanto, o verdadeiro enfarte do miocárdio raramente é observado.

1.4.3.12 Problemas psicológicos

As diversas complicações observadas nesta doença de natureza crônica, comprometem além do estado físico, o estado psicológico⁵⁸. Os pacientes vêm-se obrigados a ajustar os seus objetivos, o estilo de vida e o emprego, agravando o seu nível de stresse. Apesar dos avanços da medicina melhorarem significativamente a sobrevida, os pacientes enfrentam vários desafios ao necessitarem de tratamento médico ao longo de toda a vida^{58,59}.

A preocupação de uma possível crise de dor acompanha a trajetória de muitos indivíduos com drepanocitose e, naturalmente, as atividades sociais desvanecem-se do cotidiano, tornando a existência desses indivíduos uma jornada árdua de casa ao consultório médico e à farmácia⁴⁹. Gradualmente, problemas como depressão, ansiedade, fadiga, paranoia, sentimento de desespero e distúrbios do sono tornam-se uma realidade para estes pacientes⁴⁹.

A depressão relaciona-se com as complicações mais graves e com os piores desfechos. Está associada a uma gravidade da drepanocitose 1,5 vezes maior, a um tempo maior de internamento e à perda do funcionamento corporal^{58,59}. A imprevisibilidade do curso da doença, como intervenções hospitalares de cuidados intensivos e interações inconsistentes, pode muitas vezes resultar em ansiedade⁵⁹. A ansiedade, tal como a depressão, pode afetar os resultados do tratamento levando a internamentos mais longos⁵⁹.

1.4.3.13 Outras complicações

Além das consequências observadas mais comumente, outras sequelas podem ser observadas com menos frequência, no entanto, continuam a ser clinicamente relevantes⁴⁸.

A vaso-oclusão e isquemia da artéria retiniana podem resultar em retinopatias verificadas entre 15 a 20% dos indivíduos com doença falciforme, e a ausência de tratamento pode originar perda da acuidade visual⁴⁸.

Em pacientes do sexo feminino, as alterações fisiológicas durante a gravidez aumentam o risco de complicações⁴¹. Com o aumento das necessidades metabólicas, o aumento da viscosidade do sangue e da hipercoaguabilidade, é comum que as grávidas com drepanocitose apresentem uma variedade de doenças e complicações perinatais durante a gravidez, como pielonefrite, pré-eclampsia, trabalho de parto prematuro, restrição de crescimento intrauterino e abortos espontâneos^{41,48}. A circulação uteroplacentária pode também ser comprometida devido à possibilidade de vaso-oclusão na placenta, leva à hipoxia fetal crônica e resultados fetais adversos⁴⁸.

1.4.4 Diagnóstico

A gravidade da drepanocitose exige métodos de diagnósticos e estes variam consoante a etapa de vida, estando disponíveis vários tipos de testes: preconcepção, pré-natal e neonatal. As técnicas laboratoriais de diagnóstico são métodos que permitem a separação do tipo de hemoglobina conforme a sua estrutura, permitindo visualizar a presença da HbS. Nestes métodos incluem-se a cromatografia líquida de alta definição (HPLC), eletroforese de hemoglobina e focagem isoelétrica^{26,42}. As limitações na capacidade de distinguir a HbSS da HbS/ β^0 -talassemia e a reduzida sensibilidade da triagem neonatal devido à baixa expressão da hemoglobina adulta e, portanto, HbS, levou ao desenvolvimento de novos métodos de diagnóstico como a espectrometria de massa em tandem, análise de DNA (como PCR Taqman e sequenciação de genes *HBB* amplificados) e análise de sequenciação de nova geração²⁶.

O teste preconcepção é essencial para identificar casais portadores de drepanocitose (heterozigóticos), possibilitando deste modo o aconselhamento genético e, se o casal assim o entender, interromper a transmissão da drepanocitose⁴².

O diagnóstico pré-natal (DPN) é sugerido no início da gestação a casais com triagem pré-concepcional positiva. Neste processo obtém-se o DNA fetal a partir do líquido amniótico ou a partir de vilosidades coriônicas realizadas às 9 semanas de gestação⁴². O DPN é realizado por metodologias de genética molecular, em que a mutação drepanocítica é pesquisada no DNA fetal.

1.4.5 Tratamentos

Após a primeira descrição da drepanocitose, muito se explorou a fim de se compreender os mecanismos da doença⁶⁰. Esses esforços tiveram um impacto significativo no aumento da sobrevida na infância, mas ainda assim, nos últimos 30 anos, a expectativa média de vida desses indivíduos permaneceu inalterada^{60,61}.

A drepanocitose tornou a ser o foco nas pesquisas devido às novas terapias medicamentosas, ao tratamento através do transplante de medula óssea e à expectativa de cura através das terapias genéticas vanguardistas³⁰.

1.4.5.1 A Hidroxiureia e os outros fármacos inovadores

As opções terapêuticas para o tratamento da drepanocitose permanecem muito limitadas. Até a data, apenas quatro medicamentos foram aprovados pela *Food and Drug Administration* (FDA) para reduzir a gravidade da patologia: a Hidroxiureia (HU), aprovado em 1998 para adultos e em 2017 para crianças; a L-glutamina, aprovado em 2018; Crizanlizumab aprovado em 2019; e Voxelotor, aprovado em 2020⁶¹.

Por menor que seja a diminuição da concentração de HbS em indivíduos drepanocíticos, é considerado terapêutico devido à menor capacidade de formação das fibras de HbS. Por este motivo, uma alta concentração de HbF origina um percurso clínico menos grave^{30,60}. Este é o princípio utilizado na HU, uma medicação oral que altera a cinética da eritropoiese ao inibir a enzima RNA redutase, forçando as células a permanecerem na fase G1/S do ciclo celular^{60,62}. Assim, por meio de um mecanismo ainda desconhecido, a HU induz a síntese de HbF diminuindo a concentração de HbS intraeritrocitária, bem como a polimerização de HbS^{30,60,62}. A distribuição da HbF não é uniforme em todos os eritrócitos, caso contrário a eficácia da HU seria maior, contudo, são diversas as vantagens já comprovadas pela utilização da HU em doentes drepanocíticos³⁰. Os mecanismos adicionais da HU reduzem o impacto das comorbidades anteriormente mencionadas, como a síndrome torácica aguda, uma vez que diminui a contagem de neutrófilos, plaquetas e reticulócitos, melhora as vias anormais de inflamação associadas à SCD e corrige a concentração de NO⁶⁰. Assim, a taxa de hemólise é reduzida, o que, conseqüentemente, reduz as crises falciformes e melhora a sobrevida^{30,60}.

Os benefícios da utilização da HU estão comprovados, no entanto apenas 30% dos pacientes elegíveis fazem uso dessa medicação. Essa fraca adesão é causada por diversos fatores; alguns clínicos desconhecem a HU como tratamento para SCD, não estão convencidos do benefício ou demonstram preocupação em relação aos efeitos colaterais⁶³. A mielossupressão é o efeito colateral mais observado e pode incidir nas três linhagens celulares, uma vez que a HU atua diretamente na medula óssea⁶⁰. Outros efeitos indesejados da HU incluem hiperpigmentação, alteração da cor das unhas, alopecia, ganho de peso, náusea, problemas gastrointestinais ligeiros, erupção cutânea, dor de cabeça e pequenos aumentos na creatinina, uma vez que a HU é eliminada pelos rins^{60,62}. A diminuição da fertilidade (especialmente em homens) assim como a possibilidade da HU promover manifestações cancerígenas e teratogênicas é um assunto que suscita preocupações devido à incerteza⁶².

A HU não é uma panaceia para indivíduos com drepanocitose, os danos no baço, cérebro e rins não são totalmente evitados. Deste modo, o parecer do paciente deve ser manifestado e a monitorização laboratorial deve ser rigorosa para vigiar a ação da terapêutica⁶².

Só passados 20 anos após a aprovação da HU pela FDA, uma nova medicação oral, a L-glutamina, foi autorizada para o tratamento da drepanocitose⁶⁰. A L-glutamina é um aminoácido presente no transporte de NO e é também um precursor na síntese de nicotinamida adenina dinucleótido (NAD)^{47,60,62,64}. Embora o seu mecanismo ainda não esteja totalmente elucidado, os níveis elevados de NAD previnem os danos oxidativos que os eritrócitos sofrem^{60,65}. Uma vez que os eritrócitos falciformes são mais suscetíveis aos danos oxidativos, um aumento do NAD reduz a suscetibilidade desses danos, apontando para uma redução da hemólise e da vaso-oclusão^{47,60,65}. A sua ação foi demonstrada em estudos onde se verificou que a suplementação com L-glutamina diminuiu as hospitalizações de pacientes com drepanocitose em comparação com o grupo placebo. A toxicidade deste suplemento suscita preocupações em pacientes com insuficiência hepática ou renal, e por este motivo a sua utilização deve ser moderada^{47,60,64,65}. Efeitos colaterais como obstrução intestinal, dor abdominal e náuseas foram os mais verificados durante a fase de estudo⁶⁰.

Como referenciado previamente, a expressão de P-selectina em pacientes falciformes é elevada⁶³. Esta molécula é responsável por mediar a adesão de eritrócitos falciformes, plaquetas e leucócitos ao endotélio⁶³. Em 2018 uma nova terapia direcionada

para inibir a P-selectina foi indicada para atenuar as crises vaso-oclusivas em pacientes com doença falciforme com idade igual ou superior a 16 anos⁶³. O Crizanlizumab (Adakveo®; crizanlizumab-tmca) é um anticorpo monoclonal produzido através da tecnologia de DNA recombinante e administrado por infusão intravenosa⁶³. O mecanismo de ação deste anticorpo monoclonal passa por ligar-se à P-selectina, bloqueando deste modo a interação entre a P-selectina e o ligando *P-selectin glycoprotein ligand-1* (PSGL-1).

A administração do Crizanlizumab pode ser, ou não, combinada com a utilização da HU mas, tal como este, tem efeitos secundários negativos sendo os mais reportados a artralgia, diarreia, prurido, vômitos e dor no peito⁶³.

O Voxelotor é a segunda medicação que tem como finalidade a inibição da falciformização. O Voxelotor é um modificador alostérico da afinidade do oxigénio à hemoglobina que visa inibir a polimerização e falciformização dos eritrócitos^{30,66}. Neste sentido, o Voxelotor liga-se à HbS na sua conformação R; esta conformação tem uma alta afinidade para o oxigénio e impede a polimerização, e desta forma, a concentração de hemoglobina na conformação T é reduzida³⁰. Devido a este processo, regista-se um aumento da concentração de hemoglobina que é acompanhado pela redução da hemólise. No entanto, estes indicadores não correspondem necessariamente a uma diminuição da anemia, uma vez que moléculas de HbS ligadas ao fármaco fornecem uma quantidade ínfima de oxigénio aos tecidos, sendo inapropriado para uma patologia que já é caracterizada pela diminuição da oferta de oxigénio³⁰. Até ao momento, as evidências não são suficientes para comprovarem a diminuição das crises de células falciformes, bem como os efeitos nos danos de órgãos e melhoria da sobrevivência³⁰.

1.4.5.2 Transfusão de sangue

A terapia transfusional é um procedimento comum para a prevenção de complicações mais agudas associadas à doença falciforme cujo principal objetivo é reduzir a concentração de HbS circulante^{60,64}. O método de transfusão depende da sua finalidade e estas podem ser:

- i. Terapia crónica de transfusão, indicada essencialmente em crianças que tiveram um AVC;
- ii. Transfusão simples, é realizada sem que haja a remoção do sangue do paciente;

- iii. Transfusão de troca automática de eritrócitos, em que é utilizado um equipamento de fluxo contínuo que permite substituir o sangue do paciente pelo sangue do dador. O método proporciona diminuição da HbS de forma rápida sem aumentar o hematócrito geral ou a viscosidade sanguínea⁶⁰.

Como qualquer método, as transfusões de sangue têm as suas limitações. A longo prazo, a aloimunização (ou isoimunização) pode ser uma consequência deste tipo de terapia. A presença de antigénios na superfície dos eritrócitos transferidos desencadeia a formação de anticorpos que aumenta o risco de reações transfusionais e dificulta identificação do grupo sanguíneo compatível. O aumento dos níveis de ferritina sérica em virtude das transfusões sanguíneas (hematocromatose transfusional) é também uma das consequências que pode ser verificada em pacientes drepanocíticos. A sobrecarga de ferro é também registada na terapia crónica de transfusão devido à baixa taxa de excreção de ferro em humanos. A sobrecarga de ferro pode resultar em alterações cardíacas e hepáticas, podendo mesmo ser fatal quando não devidamente tratada. O processo de eliminação do ferro consiste numa terapia de quelação^{60,64}.

1.4.5.3 Transplante alogénico de células-tronco hematopoiéticas

As terapias medicamentosas supracitadas, assim como as transfusões de sangue, são terapias que permitem direccionar a doença para um quadro clínico mais moderado, reduzindo as crises vaso-oclusivas e as complicações agudas^{62,67}. A opção curativa para a doença falciforme está limitada ao transplante alogénico de células-tronco hematopoiéticas (TCTH), ou mais comumente referido como transplante de medula óssea, e à potencial estratégia curativa da terapia génica^{62,67}.

A correção molecular é realizada através da substituição total da medula óssea do paciente pela medula óssea de um dador, geralmente um irmão com o antígeno leucocitário humano (HLA) compatível, onde o paciente passa a expressar os eritrócitos com o gene correto da β -globina^{30,60,67}. O procedimento mostrou ser curativo em cerca de 95% dos casos de irmãos dadores, sobretudo em crianças, uma vez que, o fator idade revela ser um o risco de morbimortalidade no TCTH^{30,68}.

1.4.5.4 Terapia gênica

A escassez de oferta de TCTH, concentrou esforços na terapia gênica com intenção de cura definitiva^{62,69}. Como tal, o conceito de manipular as células-tronco do próprio paciente e transplantá-las de seguida (transplante autólogo), tem sido intensamente investigada³⁰. O sistema robusto de transferência de genes por meio de um lentivírus manipulado, poderá integrar um gene *HBB* terapêutico nos elementos regulatórios do DNA das células-tronco³⁰. Teoricamente, o sistema lentiviral promove a expressão endógena de β -globina terapêutica capaz de reverter a doença. Contudo este tipo de terapia encontra-se, ainda, em fase de investigação.

A recém-descoberta do CRISPR/Cas9 reestruturou os conhecimentos da engenharia genética verificando-se duas possíveis abordagens para o tratamento da doença falciforme:

- i. Reparação dos genes *HBB* contendo a mutação drepanocítica - A metodologia de CRISPR-Cas9 é utilizada para “cortar” a região dos genes da β -globina onde se encontra a mutação drepanocítica, utilizando as próprias células precursoras eritroides do doente. As regiões fragmentadas são corrigidas usando fragmentos molde *wild-type*, obtendo-se assim os genes corrigidos. Por último, as células precursoras eritroides modificadas para produzir a hemoglobina padrão são reimplantadas no paciente;
- ii. Aumento da HbF - Nesta abordagem a finalidade é inibir o repressor da HbF, ao mutar ou deletar o gene *BCL11A* também por metodologias de CRISPR-Cas9. Desta forma, a síntese de HbF é induzida de forma indireta⁷⁰.

Em ambas as abordagens não há necessidade de recorrer a um dador compatível uma vez que é utilizado o próprio sangue dos pacientes, alterando-se as células progenitoras hematopoiéticas com CRISPR/Cas9 que posteriormente são reimplantadas no paciente⁷⁰.

Como qualquer terapia, é importante realçar que as questões de segurança que envolvem a terapia gênica, são também uma fonte de preocupação. Entre essas preocupações inclui-se a possibilidade de edição de genes fora do alvo, mutagênese de inserção mediada por vetores e riscos inerentes à quimioterapia de alta dose necessária para o transplante autólogo de medula óssea^{30,70}.

1.4.6 Modificadores da gravidade da drepanocitose

A drepanocitose é considerada uma patologia fenotipicamente heterogênea, já que o seu curso clínico é variável e com desfechos imprevisíveis. O motivo dessa variabilidade é muitas vezes inexplicável, mas por outro lado, fatores ambientais, como por exemplo, o clima frio, o estado nutricional, o estado emocional, acesso a apoio social e a cuidados médicos foram já relatados como influenciadores nos resultados da gravidade clínica^{26,35,58,71}. A exposição ao clima frio e ventoso demonstrou precipitar as complicações agudas, embora, impressionantemente, 99% das crianças com doença falciforme em Londres sobrevive até a idade adulta enquanto que menos de 50% de taxa de sobrevivência é verificada na Tanzânia³⁵.

Para além dos fatores ambientais, a variabilidade clínica é parcialmente explicada pela co-herança de um conjunto de fatores genéticos modificadores^{26,71}. A identificação das causas dessa variabilidade torna-se benéfica, uma vez que a doença é muitas vezes diagnosticada na infância. Na possibilidade de haver um prognóstico nesta fase inicial da vida, seria proveitoso adaptar-se tratamentos individualizados, assim como o uso precoce de TCTH em pacientes habilitados a um curso clínico mais grave³⁵. O conhecimento e a determinação destas variações genéticas nos doentes drepanocíticos pode contribuir para a especificidade da intervenção terapêutica personalizada (utilização da medicina personalizada ou de precisão) consoante as características genéticas de cada indivíduo, ou até mesmo permitir o delinear de novas abordagens terapêuticas^{35,71}.

1.4.6.1 A Hemoglobina fetal

A quantidade da HbF é sem dúvida o preditor genético mais importante na anemia falciforme³⁵. É sabido que a permanência de HbF no período adulto é um fator que exerce uma atividade positiva em doentes drepanocíticos^{35,72}. A HbF permanece elevada até cerca dos 2, 3 anos de idade nestes doentes, e por este motivo, geralmente, os doentes com drepanocitose apenas manifestam sintomas após essa idade⁷². Em geral, após o *switching* de hemoglobina se completar, os níveis normais de HbF são inferiores a 1% da hemoglobina total³⁵. A variação deste valor aparenta ter uma forte influência genética, verificando-se que alguns indivíduos permanecem com os níveis de HbF elevados ao longo da vida devido a alterações nas regiões regulatórias da cadeia β -globínica que levam à inibição da conversão da γ -globina para a β - globina^{35,73}. Sankaran e Weiss,

(2015)⁸ relataram esta condição como sendo benigna, designada por persistência hereditária de hemoglobina fetal (HPFH).

Pacientes com doença falciforme exibem níveis de HbF mais elevados, variando entre 3 a 25%, com uma média de cerca de 7%³⁵. A doença falciforme origina um stresse eritropoiético crónico que impele a produção de alguma percentagem de HbF³⁵.

As observações clínicas destes indivíduos denunciam uma redução da gravidade da doença ou até mesmo a ausência de sintomas^{9,73}. Esta constatação levou a que o aumento da HbF, quer por utilização de fármacos como a HU, quer por via de manipulação genética, se torne num tratamento da drepanocitose^{9,73}. O principal mecanismo de proteção da HbF passa pelo seu aumento no interior dos eritrócitos que consequentemente interrompe a polimerização da HbS desoxigenada proporcionando um efeito antifalciforme^{26,35}. Este processo é também verificado em pacientes com um desenvolvimento mais grave da doença, uma vez que taxas elevadas de hemólise aumentam a quantidade de HbF, pelo que os níveis de HbF devem ser interpretados com cautela, juntamente com outras informações, como contagem de reticulócitos e nível de hemoglobina total³⁵.

1.4.6.2 O polimorfismo rs7482144 no gene HBG2

O interesse no aumento da HbF incentivou estudos que permitiram identificar que o nível de HbF está sujeito a controlo genético. Um dos fatores envolvidos no aumento da HbF é o polimorfismo rs7482144 (C>T) localizado no promotor do gene da γ -globina, *HGB2*, a -158nt do seu *cap site*, num local de restrição reconhecido pela enzima *Xmn I*. Alguns estudos sugerem que o alelo T nesse local permite modelar positivamente os níveis de HbF^{72,74}. Esse facto deverá ocorrer por a existência do alelo variante T impedir ou perturbar a ligação de proteínas silenciadoras da expressão do gene *HGB2* que, na situação *wild-type*, são responsáveis pela repressão da expressão deste gene no período adulto. Consequentemente a baixa repressão do gene tem como consequência a continuação da sua expressão no período adulto e assim a manutenção de um nível elevado de HbF ($\alpha_2\gamma_2$).

1.4.6.3 Os haplótipos no agrupamento génico da β -globina

Como referido anteriormente, o alelo β S encontra-se associado a um de cinco haplótipos (Bantu, Benim, Senegal, Camarões, Árabe-Indiano) que se caracterizam por um padrão de regiões polimórficas ao longo do agrupamento génico de β -globina onde o alelo β S se encontra inserido (Tabela 1.1.)^{32,33}. Dois desses haplótipos (o haplótipo Senegal e o haplótipo Árabe-Indiano) apresentam o local *Xmn* I positivo, o que corresponde ao alelo variante T do polimorfismo rs7482144 descrito no ponto acima^{75,76}. Assim, alguns estudos revelaram que o tipo de haplótipo que o doente drepanocítico apresenta irá condicionar o seu nível de HbF no período adulto e eventualmente isso condicionará a gravidade da doença^{75,77}.

1.4.6.4 A α -talassémia

Para além do nível de HbF, há ainda outros fatores que influenciam a polimerização da HbS intraeritrocitária e que, portanto, são também modificadores da gravidade da doença^{26,35}, como é o caso da co-herança de α -talassémia. Cerca de um terço dos doentes drepanocíticos com ascendência africana, co-herdam a deleção α ^{3,7} kb sendo a sua grande maioria heterozigótica. A dupla heterozigotia da drepanocitose e da α -talassémia reduz a quantidade de subunidades de α -globina que conseqüentemente limita a formação de HbS, apresentando um decréscimo da concentração de hemoglobina em cada eritrócito, oferecendo mais flexibilidade aos eritrócitos, retardando deste modo a hemólise prematura e promovendo um melhor desenvolvimento das células vermelhas^{26,35}. A α -talassémia em pacientes drepanocíticos reflete benefícios variáveis como ocorrência reduzida de AVC, das úlceras de perna e até mesmo do priapismo³⁵. Apesar dos aspetos positivos, a frequência da dor não é reduzida podendo mesmo ser agravada³⁵. De igual modo, a taxa de necrose avascular relatada aparenta aumentar com a co-herança da α -talassémia³⁵.

1.4.6.5 O polimorfismo rs1800457 no gene *CYB5R3*

Como referido, a sintomatologia da drepanocitose é altamente diversificada entre indivíduos, estando em causa a co-herança genética, fatores ambientais, influência epigenética e vantagens adquiridas por meio da seleção natural. Um exemplo deste último caso poderá ser o polimorfismo rs1800457 no gene *CYB5R3*.

O gene *CYB5R3* codifica o enzima NADH-citocromo b5 redutase responsável pela conversão da metemoglobina (MetHb) em hemoglobina⁷⁸⁻⁸⁰. Tal como referido anteriormente, na hemoglobina normal cada cadeia globínica contém um grupo prostético, o heme, o qual é formado por um anel de protoporfirina IX complexado com um átomo de ferro no estado ferroso (Fe^{2+})^{5,81}. Cada átomo de ferro no estado ferroso pode ligar, reversivelmente, uma molécula de O_2 somando um total de quatro moléculas de O_2 transportadas por cada molécula de hemoglobina⁵. Diariamente a hemoglobina sofre oxidação, por ação do stresse oxidativo e de vários agentes oxidantes, e os iões Fe^{2+} são oxidados ao estado férrico (Fe^{3+}) o qual não tem capacidade de ligar e transportar O_2 ^{80,81}. Este estado oxidado da hemoglobina é chamado MetHb e corresponde a uma hemoglobina inoperacional⁸¹.

Normalmente, os sistemas redutores naturais controlam a oxidação da hemoglobina e conseguem manter os níveis de MetHb na célula abaixo de 1%^{80,81}. O aumento dos valores basais da MetHb (metemoglobinémia) pode ser causado por uma oxidação excessiva originando assim uma elevada produção (por exemplo, desencadeado pela ingestão de veneno ou determinados fármacos) ou pela diminuição na capacidade de defesa redutora (por exemplo, insuficiência renal ou redução do metabolismo)⁸⁰. O principal responsável pela redução endógena da MetHb, é a NADH MetHb redutase, um sistema que envolve duas enzimas: a citocromo b5 e a citocromo b5-redutase. Este sistema transfere um eletrão do NADH para a MetHb e transforma-a em hemoglobina⁸². Outros sistemas, de importância menor, também contribuem para a manutenção de baixos níveis de MetHb, tais como, o ácido ascórbico, o glutationo e o NADPH desidrogenase.

As situações de metemoglobinémia podem ser adquiridas ou congénitas⁸³. As formas adquiridas (agudas) podem resultar da exposição a oxidantes diversos e eventualmente surge em situações patológicas, tais como septicémia, crise da doença falciforme e infeções gastrointestinais⁸³. Pelo contrário, a forma hereditária é causada por deficiência na enzima citocromo b5 redutase^{80,83}.

Variantes no gene *CYB5R3* podem originar duas formas de metemoglobinémia por deficiência na enzima citocromo b5 redutase: o tipo I, onde a isoforma solúvel da enzima se encontra afetada e é restrita aos glóbulos vermelhos maduros^{80,83}; o tipo II, onde a enzima mutada não tem atividade e afeta todas as variedades de células, incluindo células eritróides e não-eritróides, como fibroblastos, linfócitos e células do sistema nervoso

central^{80,83,84}. Esta forma II de metemoglobinemia é muito mais grave do que a do tipo I e encontra-se associada a cianose, atraso mental e a outros sintomas neurológicos^{83,85}.

As duas isoformas da enzima NADH-citocromo b5 redutase são ambas codificadas pelo gene *CYB5R3* que é constituído por nove exões e localiza-se no cromossoma 22q13-qter⁸⁴. Já foram descritas algumas dezenas de mutações patogénicas neste gene, que são maioritariamente do tipo *missense* e encontram-se associadas à metemoglobinemia mais suave, do tipo I^{81,85,86}. Este gene apresenta ainda variantes não patogénicas, sem efeito funcional conhecido, mas que têm elevada frequência nalgumas populações, sugerindo assim que tenham sido alvo de seleção natural positiva. É o caso da alteração *CYB5R3*: c.350C>G (rs1800457) localizada no exão 5. Trata-se uma variante *missense*, isto é, origina uma alteração de aminoácido, de Treonina para Serina, na posição 117 da proteína^{78,87}. Este polimorfismo também denominado por *CYB5R3T117S* parece ser exclusivo da população africana, correspondendo a uma frequência alélica do alelo variante de 23% em afro-americanos^{78,87} e a 34% na população africana (*1000 Genomas project, Phase3, Ensembl, 25-10-2023*), nunca tendo sido assinalado em outras etnias, o que fez com que fosse levantada a hipótese desta elevada frequência ser o resultado de uma seleção natural positiva com efeitos protetores contra a anemia provocada pela malária e pela drepanocitose em África⁷⁸.

Assim, para além dos modificadores genéticos já bem conhecidos e referidos nos pontos acima (por exemplo, em *HBG2* e em *HBA*), há a hipótese de que o polimorfismo *CYB5R3* c.350C>G possa ter uma vantagem protetora em relação à anemia drepanocítica⁷⁸. Um estudo muito recente sugeriu que a heterozigotia e a homozigotia para o alelo *CYB5R3* c.350C>G em crianças com drepanocitose aumenta a concentração média de hemoglobina em comparação com indivíduos drepanocíticos que têm os alelos *wild-type* deste polimorfismo⁷⁸. Assim, é necessário realizar mais estudos neste âmbito para validar esse resultado⁷⁸ e para certificar que este polimorfismo tem realmente valor modificador na variabilidade da anemia da drepanocitose.

2 Objetivos

A drepanocitose é uma doença monogénica cujas manifestações principais, por exemplo, anemia crónica, crises vaso-oclusivas, hemólise crónica, são bastante heterogéneas de indivíduo para indivíduo^{26,71}. Logo, há uma necessidade crescente de descobrir e entender o papel dos fatores genéticos modificadores que poderão contribuir para essa heterogeneidade, com a finalidade de compreender a fisiopatologia da doença.

Este estudo de associação genótipo / fenótipos teve como principal objetivo investigar o papel de variantes genéticas na variabilidade da expressão hematológica, bioquímica e clínica da drepanocitose em crianças.

Para este fim, pretendeu-se, em primeiro lugar, pesquisar variantes genéticas em genes, tais como, *HBA*, *HBG2*, *CYB5R3* e, ainda, caracterizar os haplótipos no agrupamento génico da beta-globina e os níveis de hemoglobina fetal em crianças previamente diagnosticadas com drepanocitose. Posteriormente pretendeu-se estabelecer associações entre a presença dessas variantes genéticas e a maior ou menor gravidade da doença drepanocítica, avaliada através de parâmetros hematológicos, bioquímicos e clínicos dos doentes.

Pretendeu-se, ainda, como objetivos secundários, implementar no laboratório duas metodologias de genética molecular. Uma baseada em PCR e sequenciação de Sanger para caracterizar a variante c.350C>G do gene *CYB5R3* e um *Gap-PCR multiplex* que possibilite a deteção simultânea das deleções talassémicas $\alpha^{3,7}$ kb e $\alpha^{4,2}$ kb em *HBA*.

De um modo geral, pretende-se com este estudo contribuir para o conhecimento dos fatores genéticos com efeito benéfico sobre os fenótipos da drepanocitose.

3 Materiais e métodos

3.1 Caracterização da amostra

3.1.1 Amostra populacional

A população envolvida neste estudo é composta por 81 crianças diagnosticadas com drepanocitose, anonimizadas, com idades compreendidas entre os 3 e os 17 anos, sendo 44 indivíduos do sexo masculino e 37 do sexo feminino. Os doentes em questão são seguidos em consultas de hematologia pediátrica em dois hospitais da região de Lisboa e participaram num projeto anterior de teor mais lato intitulado “Desenvolvimento e Validação de Preditores Precoces de Vaso-oclusão num Modelo Mendeliano de Doença Vascular”. Os seus representantes legais deram o seu consentimento informado por escrito para participarem em estudos futuros relacionados com esta patologia.

Todos os indivíduos incluídos neste projeto foram acompanhados durante um período de 3 anos por uma equipa de pediatras que compilou, para cada doente, o seu historial clínico. Os seus respetivos dados hematológicos e bioquímicos foram recolhidos em fase de inter-crise da doença (*steady-state*) por um membro do projeto anterior (Dra. Andreia Coelho). Nesse projeto anterior, a Dra. Andreia Coelho criou e registou todas as informações fenotípicas (clínicas, hematológicas e bioquímicas) numa base de dados que foi usada como base de trabalho para o estudo aqui apresentado.

As amostras de sangue, colhidas em EDTA, destes doentes foram enviadas para o Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA) para os estudos genéticos.

3.1.2 Extração de DNA

As amostras de sangue foram usadas para extração automática de DNA genómico através do equipamento MagNA Pure LC (Roche, Alemanha). A extração foi executada por elementos da Unidade de Genética Molecular do Departamento de Genética Humana do INSA.

A avaliação da qualidade e quantificação do DNA das amostras foi realizada no espectrofotómetro NanoDrop One (Thermo Fisher Scientific, EUA). A concentração de DNA (ng/μL) foi determinada a 260nm e estimou-se a razão de absorvâncias nos comprimentos de onda de 260nm e 280nm (A260/280), assim como a 230nm e a 280nm (A230/280); de modo a descartar impurezas como sais, proteínas e o fenol. Os DNAs a

considerar deveriam apresentar valores entre 1,8 e 2,0 para ambas as razões. Os DNAs foram conservados a 4°C (Sanyo Medicoool Refrigerator).

3.2 Reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction – PCR*)

A reação em cadeia da polimerase, mais conhecida por PCR, é uma técnica *in vitro* que possibilita a amplificação de uma zona específica do DNA de forma exponencial^{88,89}. A técnica permite que o DNA seja sintetizado semelhantemente ao ocorrido *in vivo*⁸⁹. Descoberta por Kary Mullis ainda na década de 80⁹⁰, este é o método de biologia molecular mais usual nos laboratórios de genética molecular para o diagnóstico de patologias⁹¹.

O material genético de cada organismo vivo é único e constituído essencialmente por quatro ácidos nucleicos; adenina (A), guanina (G), citosina (C) e timina (T), no caso do DNA; ou uracilo (U), no caso do RNA. Os ácidos nucleicos encontram-se ligados ordenadamente originando desta forma o código genético⁹¹. Esta característica é a base central do PCR; as sequências específicas dos genes ou de parte de genes são copiadas pelas polimerases mais de um milhão de vezes, originando a predominância da sequência amplificada na solução⁸⁸. Para além da polimerase (geralmente Taq DNA polimerase) e do molde de DNA que queremos amplificar, existem outros elementos essenciais para que se dê a reação, como é o caso dos *primers*, dos desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTPs) e da solução adequada contendo magnésio e solução tampão^{89,91}. Os *primers* são oligonucleótidos iniciadores de sequência curta e de cadeia simples com cerca de 20 bases, projetados de maneira complementar às extremidades da zona da cadeia molde que se pretende amplificar, o DNA polimerase prossegue a síntese das novas cadeias de DNA com adição dos dNTPs na direção 5'>3' funcionando como uma “fotocópia” molecular^{88,89,91}.

O processo é realizado em três etapas fundamentais que envolvem diferentes ciclos térmicos⁸⁹. A etapa inicial para a realização de um PCR é a desnaturação (ocorrendo entre os 94-95°C); nesta fase, a cadeia molde é desnaturada e a dupla cadeia do DNA é separada, abrindo espaço para que os *primers* possam hibridar, sendo esta etapa chamada de hibridação (realizando-se entre os 55-65°C), por fim, a polimerase assume o controlo dando lugar à etapa de extensão (frequentemente a 72°C)⁸⁹. A verificação do sucesso do

PCR é, geralmente, efetuada pela visualizado dos fragmentos de DNA amplificados por eletroforese em gel de agarose, como de seguida se explicará.

Neste trabalho, a preparação da mistura de reagentes acima indicados, prévia aos diferentes PCRs, foi realizada num compartimento específico (sala de pré-PCR), livre de contaminações destinada somente para esta finalidade. Posteriormente à preparação da mistura reacional, esta é levada para o laboratório, subdividida por vários tubos de PCR (*eppendorfs*) onde são adicionados os respetivos DNAs. Todos os PCRs são planeados para terem uma reação onde não é inserido DNA – controlo negativo.

Subsequentemente, as reações de PCR foram realizadas num termociclador, Thermocycler (T1 ou T Gradient; Biometra®), equipamento destinado à gestão cíclica das temperaturas pretendidas.

A metodologia de PCR neste trabalho, foi usada como metodologia base para a execução de três metodologias diferentes de genética molecular destinadas à identificação de quatro variantes genéticas, duas de origem delecional e duas alterações pontuais, envolvendo 3 genes diferentes. As metodologias executadas para a identificação de cada variante genética encontram-se apresentadas em detalhe na tabela 3.1.

Tabela 3.1. Identificação dos genes em foco e metodologia utilizada para a deteção da respetiva variante genética

Gene	Variante genética	Metodologia
<i>HBA</i>	Deleção $\alpha^{3,7\text{kb}}$ Deleção $\alpha^{4,2\text{kb}}$	<i>Multiplex gap</i> -PCR
<i>HBG2</i>	rs7482144	PCR-RFLP
<i>CYB5R3</i>	rs1800457	PCR + Sequenciação de Sanger

3.2.1 Eletroforese em gel de agarose

De modo a avaliarmos o sucesso e qualidade dos resultados da amplificação do DNA através de um PCR, ou de uma metodologia baseada nesta, como por exemplo, no *multiplex gap*-PCR, a verificação dos produtos amplificados foi realizada através de eletroforeses em géis de agarose contendo Brometo de Etídeo (BrEt). Esta técnica permite a migração dos fragmentos de DNA amplificados pelos poros do gel de agarose de acordo com a sua carga e com os respetivos tamanhos após a aplicação de uma corrente elétrica capaz de gerar diferença de potencial. Uma vez que as moléculas de DNA são carregadas negativamente, estas migram em direção ao polo positivo e verifica-se também uma separação dos mesmos consoante o tamanho; sendo assim, os fragmentos de maior dimensão ficam retidos numa etapa inicial do gel, enquanto os fragmentos menores irão migrar mais rapidamente.

Para uma estimativa do tamanho dos fragmentos separados na eletroforese, usa-se, como referência, um marcador de peso molecular que por comparação da posição dos seus fragmentos que têm pesos moleculares conhecidos, permite determinar aproximadamente o tamanho dos fragmentos amplificados.

Assim, em primeiro lugar, e num processo anterior à eletroforese, preparou-se o gel de agarose na concentração adequada. Este foi elaborado com tampão Tris-Borato-EDTA (TBE) 1x e concentrações de agarose (SeaKem® LE), variadas, geralmente 1 ou 2% (p/v), adequadas ao tamanho dos fragmentos amplificados. A agarose foi fundida no TBE por ação do calor e após esse processo foi adicionado 4µl de BrEt (10mg/mL, Sigma®). O BrEt funciona como intercalante de DNA, moléculas que se incorporam entre os pares de base do DNA, e que permitem a visualização dos fragmentos sob luz ultra-violeta. A solução originada foi vertida num suporte molde retangular (BioRad) onde foi encaixado um pente que deu origem aos poços do gel após solidificação. Todo este processo foi realizado numa hote, uma vez que o BrEt é mutagénico.

Os produtos obtidos após PCR, ou outra metodologia baseada nesta, têm de ser preparados antes da sua aplicação no gel. Geralmente, a 8µL de produto de PCR adicionou-se 5µL de uma solução de deposição para dar densidade à amostra (através do glicerol) e lhe atribuir cor (através do corante azul de bromofenol). As misturas foram aplicadas nos poços do gel e as eletroforeses foram efetuadas em equipamentos de eletroforese apropriados a esta finalidade; PowerPac300 ou PowerPac Basic (Bio-Rad).

As condições de cada electroforese (voltagem e tempo de execução) variaram de acordo com o tamanho dos fragmentos a separar e encontram-se detalhadas nas diferentes tabelas apresentadas para as diferentes metodologias na secção dos anexos.

Após a electroforese os géis foram visualizados numa câmara de raios ultravioleta (Uvitec, Cambridge), uma vez que o BrEt intercalado nas moléculas de DNA vai emitir fluorescência sob UV. Foram realizados os respetivos registos fotográficos.

3.3 *Multiplex gap-PCR*

O *multiplex gap-PCR* é uma técnica baseado em PCR que por meio da utilização de vários *primers* específicos permite identificar simultaneamente várias deleções conhecidas. Neste estudo pretendeu-se pesquisar simultaneamente as deleções de 3,7kb e de 4,2kb no agrupamento génico da α -globina, numa mesma reação de PCR.

A metodologia foi adaptada de Tan *et al.* 2001⁹². O método é uma variante do PCR convencional, pelo que segue os mesmos princípios descritos anteriormente. Assim sendo, para além das condições reacionais típicas de um PCR já mencionadas, usam-se três conjuntos de *primers* específicos, diretos e reversos, que limitam as regiões externas das deleções em questão, tal como representado no esquema da Figura 3.1.A.

O procedimento foi realizado com a preparação de apenas uma mistura de PCR para cada amostra de DNA, em que todos os reagentes e *primers* se encontravam presentes. Sempre que possível, para além das amostras de DNA a diagnosticar, foram usadas também amostras de controlos positivos, neste caso amostras anteriormente diagnosticadas com a deleção 3,7kb e outra com a deleção 4,2kb. Tal como para qualquer outro PCR, é acrescentada uma reação contendo todos os reagentes da mistura reacional, mas à qual não é adicionado DNA – controlo negativo.

As sequências dos *primers* e as condições de PCR usadas neste trabalho para o *multiplex gap-PCR* para pesquisa simultânea das deleções de 3,7kb e de 4,2 kb no agrupamento génico da α -globina encontram-se descritas nas Tabelas 7.1 e 7.2 em anexos.

Após a realização do *multiplex gap-PCR* no termociclador Thermocycler (T1 ou T Gradient; Biometra®) as reações foram migradas num gel de agarose a 1%, e realizada a electroforese a 70V durante 90min. O gel foi depois fotografado sob UV. A análise do

tamanho dos fragmentos amplificados por comparação com o tamanho dos fragmentos do marcador de peso molecular permite a detecção de um dos seis genótipos diferentes ($\alpha\alpha/\alpha\alpha$; $\alpha\alpha/-\alpha^{3,7}$; $-\alpha^{3,7}/-\alpha^{3,7}$; $\alpha\alpha/-\alpha^{4,2}$; $-\alpha^{3,7}/-\alpha^{4,2}$ e $-\alpha^{4,2}/-\alpha^{4,2}$) como esquematizado na Figura 3.1.B.

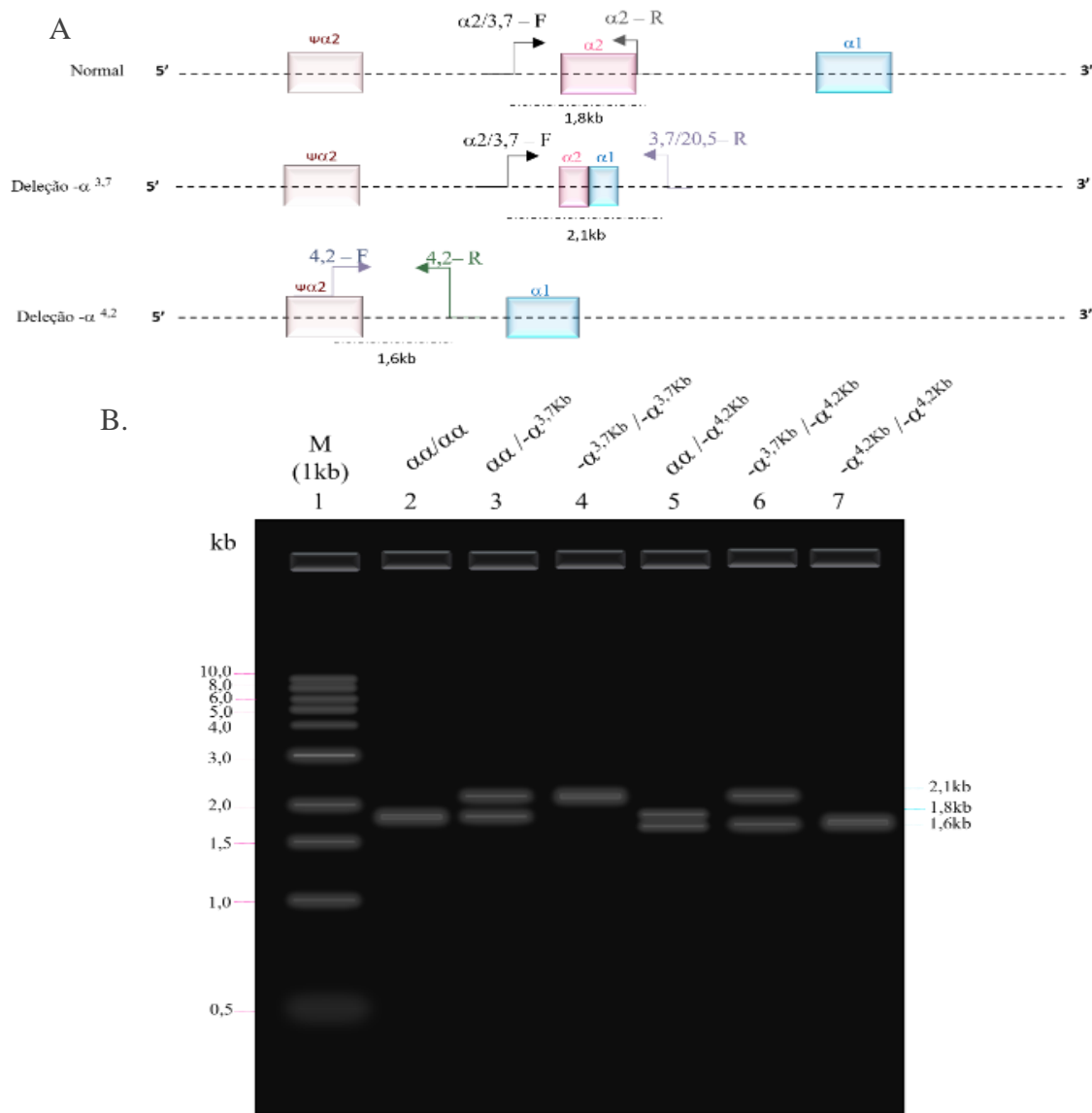


Figura 3.1. Representação esquemática do diagnóstico da α -talassemia através do *Multiplex Gap-PCR*. (A) Representação esquemática dos genes e dos *primers* que permitem a amplificação diferencial das deleções de 3,7kb e 4,2 kb na origem das alfa-talassémias mais comuns. Adaptado de Tan *et al.*, 2001⁹². (B) Representação de um gel de agarose a 1% (p/v) após a eletroforese dos produtos amplificados. A representação demonstra o marcador de peso molecular (M) e os fragmentos amplificados na presença dos seis genótipos possíveis. A posição 2 representa uma amostra sem deleção nos genes α ($\alpha\alpha/\alpha\alpha$) verificando-se um fragmento de 1,8kb; na 3ª posição apresenta-se uma heterozigotia para a deleção $\alpha^{3,7}$ ($\alpha\alpha/-\alpha^{3,7}$) na qual se revela um fragmento de 1,8kb e outro de 2,1kb; a homozigotia para a deleção $\alpha^{3,7}$ ($-\alpha^{3,7}/-\alpha^{3,7}$) é observada na 4ª posição apenas com a visualização de um fragmento de 2,1kb; na 5ª posição representa-se uma heterozigotia para a deleção $\alpha^{4,2}$ ($\alpha\alpha/-\alpha^{4,2}$) onde se visualizam 2 fragmentos de 1,8 e 1,6 kb; a 6ª posição demonstra um genótipo de heterozigotia para as deleções $\alpha^{3,7}$ e $\alpha^{4,2}$ ($-\alpha^{3,7}/-\alpha^{4,2}$) pelo que apresenta um fragmento de 2,1kb e outro de 1,6kb; a 7ª e última posição corresponde a uma homozigotia para a deleção $\alpha^{4,2}$ ($-\alpha^{4,2}/-\alpha^{4,2}$) com a visualização de apenas um fragmento de 1,6kb.

3.4 Restrição enzimática (PCR - *Restriction Fragment Length Polymorphism*)

O PCR-RFLP (*polymerase chain reaction - restriction fragment length polymorphism*), desenvolvido por Alec Jeffreys em 1984, é uma técnica simples e sensível que permite identificar variantes genéticas (geralmente alterações pontuais), com ou sem significado clínico, que alterem (criem ou anulem) um local de restrição de uma enzima de restrição (endonuclease)⁹³. Assim, as variantes genéticas conhecidas que cumpram esta condição podem ser detetadas por este método, após as sequências genômicas serem amplificadas por PCR. Esta técnica utiliza a capacidade que as endonucleases têm de reconhecer zonas específicas do DNA, geralmente palíndromas e aí atuarem como “tesouras biológicas” que cortam as ligações entre o grupo hidroxilo 3’ de um nucleótido e o grupo fosfato 5’ do nucleótido seguinte⁹⁴. Um local de restrição modificado por uma variante genética origina uma alteração do tamanho e do número de fragmentos de DNA que pode ser visualizado por meio de uma eletroforese⁹⁵.

No estudo em questão utilizou-se a endonuclease *Xmn* I a fim de se caracterizar o SNP rs7482144 (C>T) localizado na posição -158 nt a montante (no promotor) do gene *HBG2*. Para esta finalidade, realizou-se um PCR para cada uma das amostras que englobou o local de interesse. As condições do PCR encontram-se detalhadas nas Tabelas 7.3. e 7.4 em anexo.

Após o PCR, os produtos da amplificação foram incubados na presença da endonuclease *Xmn* I, a 37°C, *overnight* (Eppendorf Thermomixer® Compact) como apresentado na Tabela 7.5 em anexo, onde também é possível observar-se o palíndromo da enzima. Após a atuação da enzima, esperou-se observar um dos três resultados possíveis: ausência de hidrólise, resultando num fragmento de tamanho 677pb, sendo isto devido à presença de dois alelos C; hidrólise que origina dois fragmentos, 462pb e 215pb, significando a presença de dois alelos T; e a hidrólise de apenas um dos alelos (heterozigotia), resultando três fragmentos: 677pb, correspondendo à presença do alelo

C, 462pb e 215pb referentes à hidrólise da enzima, ou seja presença do alelo T. Assim, pode-se observar os três genótipos possíveis: C/C, C/T e T/T (Fig. 3.3.).

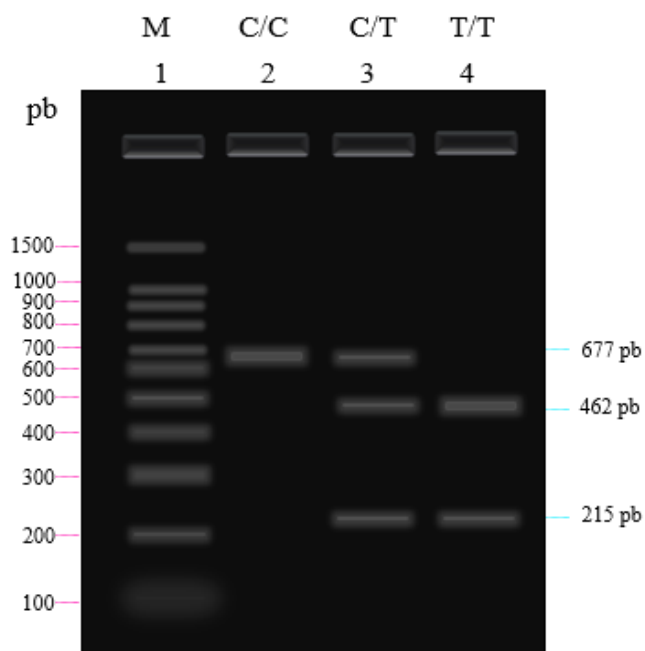


Figura 3.2. Representação esquemática da separação eletroforética dos produtos da restrição enzimática com *Xmn* I do promotor do gene *HBG2* previamente amplificado por PCR. A representação demonstra o marcador de peso molecular de 100pb (M) na posição 1; na posição 2, verifica-se a presença do alelo C em homozigotia que não permite a hidrólise do fragmento original (677pb); a posição 3, corresponde a uma heterozigotia C/T, verificando-se a presença de três fragmentados, 677, 462 e 215pb; a última posição representa uma amostra homozigótica T/T apresentando apenas dois fragmentos que correspondem à restrição dos dois alelos.

Neste estudo, a verificação dos resultados após restrição enzimática, foi assegurada através de eletroforese em gel de agarose (Seakem LE Agarose, Lonza) a 2% (p/v), em TBE 1x suplementado com 4µL de EtBr (Sigma®) a 70V durante 1h. A revelação do gel foi realizada na câmara de radiação UV (Uvitec, Cambridge).

3.5 Sequenciação de Sanger

A sequenciação de Sanger foi desenvolvida por Frederick Sanger em 1975, mas apenas em 1977 foi partilhada pelo mundo científico^{96,97}. Deste então, a técnica tem sido essencial no enriquecimento do conhecimento do genoma humano⁹⁷.

A sequenciação de Sanger permite determinar a ordem dos nucleótidos numa amostra de DNA de um organismo, utilizando-se a capacidade dos ddNTPs (dideoxirribonucleotidos trifosfatados) interromperem a progressão da síntese da cadeia de DNA⁹⁸. Ao contrário dos dNTPs que apresentam um grupo hidroxilo (OH) ligado ao carbono 3' da desoxirribose, esse hidroxilo está ausente nos ddNTPs. A presença do hidroxilo é necessária para que ocorra a ligação química entre as unidades que formam a cadeia de DNA; visto que o oxigênio permite estabelecer duas ligações, este serve como intermediário na ligação do carbono 5' do dNTP seguinte. A presença de um ddNTP ligado à extremidade da cadeia de DNA impede que uma outra molécula de dNTP se ligue e, desta forma, impulsiona a terminação da extensão da cadeia. Como resultado, cada fragmento adquirido terá um tamanho diferente conforme a quantidade de nucleótidos ligados^{97,98}.

A reação de sequenciação de Sanger é uma técnica similar ao PCR que requer um molde de DNA a ser sequenciado, tampão, um *primer*, Taq polimerase, deoxinucleotidos (dNTPs) e ddNTPs marcados com fluorescência.

Os produtos da reação de sequenciação são separados com base no seu tamanho por eletroforese capilar (utilizando o equipamento 3500 Genetic Analyzer, Applied Biosystems). Os ddNTPs marcados com fluorescência ao passarem pelos capilares são excitados e emitem um comprimento de onda que é traduzido num cromatograma, onde o fragmento de menor dimensão corresponde ao início da sequenciação⁹⁷.

A fim de se proceder à sequenciação de regiões específicas do DNA de cada uma das amostras, realizou-se previamente um PCR para a amplificação das regiões de interesse. A confirmação das amplificações foi verificada através do gel de agarose. De seguida, as amostras foram submetidas a uma purificação através das enzimas *Exonuclease I and Shrimp Alkaline Phosphatase* (ExoSAP-ITTM).

O ExoSAP-IT hidrolisa o excesso de *primers* e nucleótidos provenientes da amplificação por PCR. Após a adição de 2µL de ExoSAP-ITTM PCR Product Cleanup Reagent (Applied BiosystemsTM) a 5 µL de produto amplificado de cada uma das amostras, estas sofreram dois processos de incubação (Thermocycler T1; Biometra®); o primeiro a 37°C onde ocorreu uma digestão dos *primers* em excesso e desfosforilação dos nucleótidos; o segundo a 80°C onde se procedeu à inativação dos enzimas.

Neste trabalho, a metodologia de PCR seguida de sequenciação de Sanger foi usada para a pesquisa da variante c.350C>G no gene *CYB5R3*. Esta foi realizada através da amplificação por PCR do exão 5 do gene *CYB5R3* das amostras de DNA de cada um dos 81 indivíduos seguindo as condições de reação descritas na Tabela 7.6 e Tabela 7.7 em anexo. Posteriormente as amostras amplificadas foram submetidas a purificação por exo-SAP, e seguiram para sequenciação de Sanger com o *primer* direto ou reverso.

A eletroforese capilar foi realizada pela Unidade de Tecnologia e Inovação (UTI) do Departamento de Genética Humana do INSA. As sequências foram analisadas com recurso ao software FinchTV v1.4.0 (Geospiza Inc.).

3.6 Haplótipos no agrupamento génico da β -globina

A determinação dos haplótipos do agrupamento génico da β -globina na população com drepanocitose analisada no presente estudo foi realizada anteriormente pela colega Dra. Andreia Coelho e envolveu os mesmos indivíduos em estudo. Para a sua determinação a Dra. Andreia Coelho recorreu à metodologia PCR-RFLP e investigou os locais polimórficos por meio da restrição enzimática com quatro enzimas de restrição (*Hinc* II, *Xmn* I, *Hind* III, *Hinf* I). O conjunto do resultado da digestão dos quatro enzimas ao longo do agrupamento génico, forma um padrão que possibilita definir o haplótipo do indivíduo (Tabela 1.1.), onde (+) indica a presença de restrição enzimática e (-) a não restrição.

A informação contendo o haplótipo de cada um dos indivíduos encontrou-se disponibilizada na base de dados. Nesta dissertação pretendeu-se verificar se os haplótipos no agrupamento génico da β -globina anteriormente determinados (Bantu, Benim ou Senegal) são fatores modificadores dos fenótipos hematológicos, bioquímicos e clínicos dos doentes em estudo pelo que se procedeu ao estudo de associação genótipo /fenótipo usando os testes estatísticos referidos no ponto 3.8.

3.7 Estudo bioinformático

A análise bioinformática foi elaborada através de bases de dados de acesso público e de vários *softwares* bioinformáticos. O recurso ao Ensembl (<https://www.ensembl.org/index.html>) e ao NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

permitiu a obtenção das sequências genéticas *wild-type* dos genes em estudo, bem como a localização das variantes genéticas e a verificação das respectivas frequências alélicas em diferentes populações. Além das bases de dados citadas anteriormente, recorreu-se também aos *softwares* PolyPhen-2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>) e OMIM® (<https://www.omim.org/>) a fim de averiguar a importância clínica das variantes genéticas e se estas foram relacionadas com associação da alteração de um fenótipo.

3.8 Análise estatística

A análise de estatística descritiva dos dados hematológicos, bioquímicos e clínicos registados na base de dados foi realizada através do *software IBM SPSS Statistics* (Versão 28.0.1.0). O equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) para cada variante foi calculado manualmente assim como as frequências alélicas e genotípicas.

A normalidade da distribuição das variáveis foi testada pelo teste Shapiro-Wilk. Para as variáveis que apresentam uma distribuição normal, realizaram-se os testes paramétricos teste-t de amostras independentes ou ANOVA (post hoc-SNK) e para aquelas que não seguiam uma distribuição normal, realizaram-se os testes não paramétricos Mann-Whitney ou Kruskal-Wallis. Para as variáveis dicotómicas, realizou-se o teste χ^2 . Assumiu-se significância estatística para $p\text{-value} < 0,05$.

4 Resultados e discussão

4.1 Caracterização demográfica da população em estudo

Neste estudo, avaliámos a compilação dos registos pediátricos de 81 crianças, diagnosticadas com drepanocitose. Os registos médicos foram elaborados em consultas realizadas pelos pediatras, em períodos de *steady state* e durante um período de três anos.

Das crianças envolvidas no presente estudo, 44 indivíduos são do sexo masculino (54,3%) e 37 do sexo feminino (45,7%). As idades dos indivíduos, à entrada no estudo, estão compreendidas entre os 3 e os 17 anos, sendo a idade média de 9,6 anos; desvio padrão 4,2 e mediana de 9,2 anos.

A Figura 4.1. permite verificar a distribuição das 81 crianças consoante o sexo e a idade. É possível constatar que a faixa etária que apresenta maior número de crianças do sexo masculino é a de 5 anos (n=6) e aquela com mais crianças do sexo feminino é a dos 9 anos (n=6). A faixa etária onde há maior número de participantes é de 9 anos (n=11).

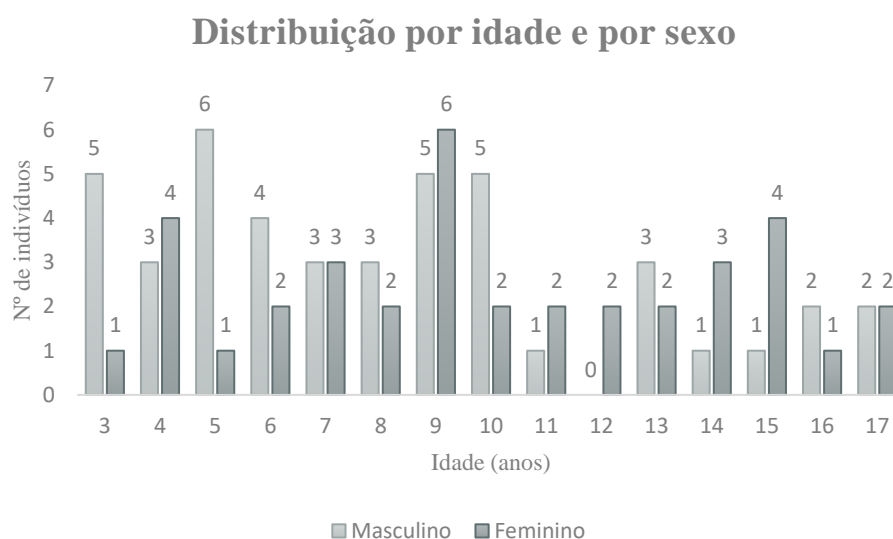


Figura 4.1. Distribuição por idade e por sexo da população. A representação gráfica demonstra a idade da população em estudo que está compreendida entre os 3 e os 17 anos, em função do número de indivíduos de cada sexo.

Embora a avaliação clínica dos participantes tenha decorrido nos hospitais da região da grande Lisboa, nem todas as crianças são portuguesas ou têm ancestralidade portuguesa. Assim, 52 crianças (64,2%) têm a sua origem geográfica em Portugal enquanto 29 (35,8%) tem origem geográfica num país africano: Angola – 17 (21,0%),

São Tomé – 5 (6,2%); Guiné-Bissau – 4 (4,9%), Senegal – 2 (2,5%) e Cabo Verde – 1 (1,2%), (Tabela 4.1 e Figura 4.2). Contudo, analisando a origem geográfica dos progenitores dos participantes é facilmente observado que apenas um casal de progenitores tem origem em Portugal e que os restantes casais de progenitores são originários de países africanos, maioritariamente de Angola (n = 50; 61,7%), (Tabela 4.1).

Tabela 4.1. Origem geográficas da população estudada e dos seus progenitores

Origem geográfica dos participantes	n	%
Angola	17	20,99
Cabo Verde	1	1,23
Guiné-Bissau	4	4,94
Portugal	52	64,20
São Tomé	5	6,17
Senegal	2	2,47
Origem geográfica dos progenitores	n	%
Angola	50	61,73
Cabo Verde	2	2,47
Guiné-Bissau	10	12,35
Portugal	1	1,23
São Tomé	10	12,35
Senegal	1	1,23
Dupla origem	7	8,64

n – Representa o número de indivíduos

Origem geográfica das crianças em estudo

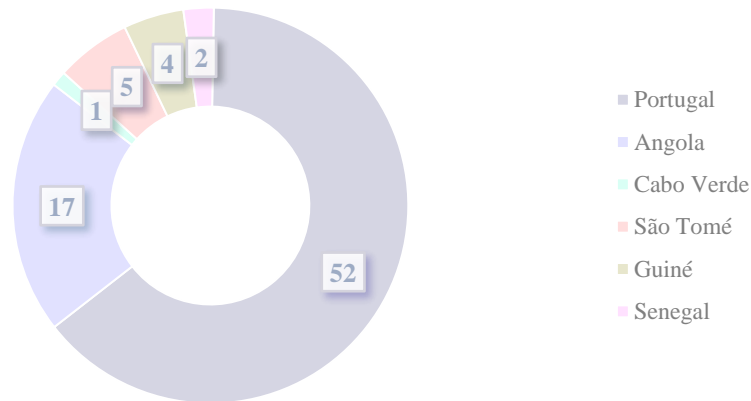


Figura 4.2. Distribuição da origem geográfica da população de participantes. O gráfico mostra o país de origem das crianças participantes no estudo. Verifica-se que a maioria das crianças nasceu em território português embora os seus progenitores sejam quase exclusivamente de origem africana (ver figura 4.3).

A drepanocitose é uma patologia de elevada prevalência em regiões endémicas de malária, como é o caso da África subsaariana e das regiões banhadas pelo Mediterrâneo. Contudo, os resultados referentes à origem geográfica das crianças estudadas neste trabalho indicaram que Portugal tem a maior representatividade no que diz respeito à naturalidade da amostra, embora Portugal não corresponda a uma região endémica de malária e tampouco a uma região de elevada prevalência de drepanocitose.

Assim, houve a necessidade de se averiguar a naturalidade dos progenitores das 52 crianças naturais de Portugal. Desta forma, os dados relativos à naturalidade dos progenitores dessas crianças encontram-se detalhados na Figura 4.3. A análise permite verificar que 33 casais de progenitores são naturais de Angola, 5 da Guiné-Bissau, 5 de São Tomé, 1 de Cabo Verde e 6 casais de naturalidade mista (2 casais de Senegal e Angola, 2 de São Tomé e Angola, 1 da Guiné e Angola e 1 de Cabo Verde e Angola). Assim, podemos concluir que há apenas um casal de progenitores com origem portuguesa (1,9%) e que todos os outros têm origem africana (98,1%), sendo esta maioritariamente angolana. Logo, mesmo as crianças que nasceram em Portugal (n=52) têm, na sua quase totalidade, ascendência africana (n=51; 98,1%), (Figura 4.3).

Naturalidade dos progenitores das crianças naturais de Portugal

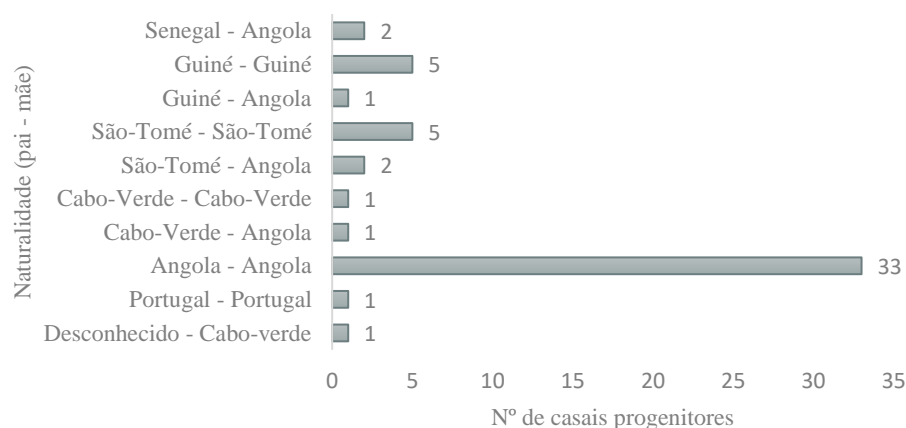


Figura 4.3. Naturalidade dos progenitores das crianças naturais de Portugal. Observa-se que a naturalidade dos casais de progenitores das 52 crianças nascidas em Portugal é maioritariamente africana (98,1%). O país africano do qual provêm mais casais de progenitores é Angola.

Os nossos resultados vão ao encontro das observações mencionadas na literatura de que as migrações populacionais têm vindo a dispersar a drepanocitose em diversas áreas geográficas^{16,26,36}. Assim, ao longo dos anos as migrações populacionais têm espalhado pelo mundo a drepanocitose, a partir dos seus locais de origem (África e península Arabo-Indiana). Esta razão explica o nascimento de crianças com drepanocitose em território português de progenitores provenientes das regiões onde a prevalência da drepanocitose é elevada, nomeadamente dos PALOP. Este é o fruto de uma imigração recente muito devido à procura de melhores condições de trabalho e de vida do que as existentes nos respetivos países de origem.

Contudo em Portugal é também conhecida a presença da drepanocitose devido a migrações muito mais antigas. Com o trabalho escravo, no séc. XV e adiante, escravos africanos foram forçados a trabalhar em campos de arroz situados ao longo dos rios Tejo, Sado e Guadiana, locais estes onde a malária era endémica. Sendo os portadores de drepanocitose mais resistentes à malária, estes locais passaram também a ser os principais focos de portadores de drepanocitose^{99,100}.

4.2 Caracterização dos parâmetros hematológicos, bioquímicos e clínicos

No âmbito das consultas das crianças estudadas, as amostras sanguíneas foram colhidas e analisadas e os dados hematológicos, bioquímicos e clínicos foram registados numa base de dados. Esta base de dados, fornece informações laboratoriais tais como, níveis de hemoglobina total (hemoglobina), contagens de eritrócitos, reticulócitos, volume globular médio (VGM), hemoglobina globular média (HGM), hematócrito, *red cell distribution width* (RDW), leucócitos, neutrófilos, plaquetas, HbF, HbS, bilirrubina total e lactato desidrogenase (LDH). As informações clínicas e os incidentes evolutivos encontram-se também inseridas no mesmo documento, sendo avaliados parâmetros como icterícia, litíase biliar, esplenomegalia, hepatomegalia, doença pulmonar crónica, hipertensão pulmonar, cardiopatias e êxito fatal. O conjunto desses dados permitiu averiguar a gravidade da anemia e das restantes manifestações da doença nas crianças drepanocíticas integradas neste estudo.

A partir dos registos existentes na base de dados realizou-se um estudo estatístico descritivo referente às informações hematológicas e bioquímicas dos participantes, cujos resultados se encontram na Tabela 4.2.

Pela análise dos parâmetros hematológicos destaca-se a ausência de HbA e a presença de um valor médio elevado de HbS ($81,95 \pm 7,24\%$). Este valor de HbS encontra-se dentro do valor referido na literatura para doentes homocigóticos para a mutação drepanocítica¹⁰¹. Para além disso, é também visível um valor médio elevado de HbF ($11,77 \pm 7,07\%$), considerando aqueles que são os valores normais deste parâmetro (cerca de 1%)⁵.

Segundo a Direção Geral da Saúde (DGS)¹⁰², os valores de referência da população portuguesa para a contagem de eritrócitos e hemoglobina considerando a média de idades apresentada ($9,6 \pm 4,17$ anos) é, respetivamente, de $3,80-5,40 \times 10^{12}/L$ e de $11,0-14,0$ g/dL. Tendo em consideração esses valores de referência, verificamos alterações no que diz respeito à população em estudo, dado que nesta, a média da contagem de eritrócitos é $3,04 \pm 0,53 \times 10^{12}/L$, e a média da hemoglobina é $7,97 \pm 0,90$ g/dL. Estes parâmetros sugerem de imediato uma compatibilidade com os valores característicos de indivíduos com drepanocitose, uma vez que se encontram abaixo dos de referência e são coerentes com a doença ser uma anemia crónica.

No que concerne aos parâmetros hematimétricos VGM e HGM, os valores médios destes encontram-se dentro dos valores de referência, uma vez que os limites normais fornecidos pela DGS¹⁰² correspondem, respetivamente, a 72,0 – 86,6 fL e 26,0 – 34,0 pg. Também aqui estes valores são coerentes com o descrito para a drepanocitose, que é considerada uma anemia normocítica e normocrômica. Apesar do valor médio da HGM se encontrar dentro dos valores normais, esta média aproxima-se do limite inferior o que pode ser devido à co-herença de α -talassémia como será referido mais tarde.

A percentagem de hematócrito considerada normal para a idade pediátrica estabelecida pela DGS, é 34,7 – 46,0 %. Comparando com a média da população em estudo ($23,71 \pm 2,56\%$), verificamos que se encontra abaixo desse valor, indicando uma baixa quantidade de eritrócitos, característica essa associada à anemia hemolítica.

Os valores normais correspondentes à contagem de leucócitos são $4,0 - 10,0 \times 10^9/L$, pelo que a média das crianças integrantes nesse estudo no que diz respeito a esse parâmetro, encontra-se ligeiramente aumentada ($12,81 \pm 4,34 \times 10^9/L$). Comparando com os valores da DGS¹⁰² correspondentes à concentração de neutrófilos e de plaquetas $1,5 - 8,5 \times 10^9/L$ e $140 - 440 \times 10^9/L$, respetivamente, podemos verificar que esses valores tendem para o limite máximo dos valores normais. Como verificado no capítulo da Introdução, o aumento destes três parâmetros pode ser o resultado das lesões tecidulares originadas pelas vaso-oclusões; além disso, a subsequente produção excessiva desses parâmetros contribuem ainda mais no progresso das crises vaso-oclusivas características da drepanocitose, tornando-se um ciclo repetitivo.

A percentagem de reticulócitos, a concentração de LDH e de bilirrubina total permitem ter uma perceção da lise celular (grau de hemólise dos glóbulos vermelhos) na população em estudo, visto que esses parâmetros são biomarcadores de hemólise. Segundo os valores de referências, a percentagem de reticulócitos deve estar compreendida entre 0,5 – 1,5%. Comparando com a população em estudo, verificamos um aumento da produção deste componente hematológico. Da mesma forma, constata-se também um aumento da LDH e da bilirrubina total, uma vez que os valores de referência correspondem, respetivamente, a 100,00 – 250,00 U/L e $< 1,2 \text{ mg/dL}$. Quando associados a um baixo nível de hemoglobina e de eritrócitos, estes valores são compatíveis com uma elevada taxa de hemólise que se refletem numa anemia severa ($\text{Hb} < 8,0 \text{ g/dL}$), segundo a Tabela 4.3 disponibilizada pela Organização Mundial de Saúde¹⁰³.

Tabela 4.2. Estatística descritiva dos parâmetros hematológicos e bioquímicos das crianças drepanocíticas estudadas

Variável	N	Média ± DP	Mínimo	Máximo	Mediana
Eritrócitos ($10^{12}/L$)	80	3,04 ± 0,53	2,20	5,10	2,97
Hemoglobina (g/dL)	81	7,97 ± 0,90	6,30	9,90	7,80
Reticulócitos (%)	79	12,36 ± 5,47	1,40	25,90	11,90
Hematócrito (%)	80	23,71 ± 2,56	18,40	30,00	23,60
VGM (fL)	80	79,24 ± 8,83	55,00	96,40	80,90
HGM (pg)	80	26,78 ± 3,34	19,00	34,00	27,10
RDW (%)	80	22,12 ± 3,13	15,30	29,40	21,85
HbS (%)	25	81,95 ± 7,24	69,90	93,00	83,90
HbF (%)	46	11,77 ± 7,07	1,80	27,80	10,00
Leucócitos ($10^9/L$)	80	12,81 ± 4,34	5,10	26,80	11,75
Neutrófilos ($10^9/L$)	80	6,05 ± 3,04	2,20	19,60	5,35
Plaquetas ($10^9/L$)	80	419,11 ± 118,99	137,00	768,70	432,25
LDH (U/L)	26	737,16 ± 229,15	271,00	1318,00	730,50
Bilirrubina total (mg/dL)	74	3,01 ± 1,59	0,90	8,00	2,55

N – Representa o número de indivíduos analisados em cada variável

VGM – Volume globular médio; HGM – Hemoglobina globular média; RDW – *Red cell distribution width*; HbS – Hemoglobina S; HbF – Hemoglobina fetal; LDH – Lactato desidrogenase

Tabela 4.3. Categorias da gravidade da anemia

População	Anemia (Hb – g/dL)		
	Ligeira	Moderada	Severa
6 – 59 meses	10,0 – 10,9	7,0 – 9,9	< 7,0
5 – 11 anos	11,0 – 11,4	8,0 – 10,9	< 8,0
12 – 14 anos	11,0 – 11,9	8,0 – 10,9	< 8,0

Classificação disponível em *Haemoglobin concentrations for the diagnosis of anaemia and assessment of severity*, Organização Mundial de Saúde, 2011.¹⁰³

Adicionalmente, a análise referente à informação clínica foi também realizada (Tabela 4.4). Todas as crianças em estudo passaram por incidentes evolutivos. Do que foi relatado, em 79 crianças, 60 (75,95%) teve icterícia; uma consequência do excesso de bilirrubina total provocado pelo alto índice de destruição dos eritrócitos. Num universo de 59 crianças, 26 (44,07%) tiveram litíase biliar. Todas as crianças no presente estudo

tiveram algum tipo de cardiopatia, mais propriamente, 81 (100%) apresentaram sopro cardíaco e 42 de 59 (71,19%) teve alguma outra cardiopatia. Em 75 crianças, 11 (14,67%) apresentaram esplenomegalia e em 24 de 74 (32,43%) verificou-se hepatomegalia. Em 80 crianças, duas (2,50%) tiveram doença pulmonar crónica, no entanto, nenhuma delas apresentou hipertensão pulmonar. Relativamente ao êxito fatal, lamentavelmente, foi registado em uma (1,20%) das crianças. Daqui podemos concluir que as manifestações cardíacas são dos problemas clínicos mais comuns apresentados pelas crianças com drepanocitose.

Tabela 4.4. Frequência relativa das complicações clínicas

Variável	N	Sim (%)	Não (%)
Incidentes evolutivos	81	81 (100,00)	0 (0,00)
Icterícia	79	60 (75,95)	19 (24,05)
Litíase biliar	59	26 (44,07)	33 (55,93)
Esplenomegalia	75	11 (14,67)	64 (85,33)
Hepatomegalia	74	24 (32,43)	50 (67,57)
Doença pulmonar crónica	80	2 (2,50)	78 (97,50)
Hipertensão pulmonar	79	0 (0,00)	79 (100,00)
Cardiopatia	81	81 (100,00)	0 (0,00)
Sopro cardíaco	81	81 (100,00)	0 (0,00)
Outra cardiopatia	59	42 (71,19)	17 (28,81)
Êxito fatal	81	1 (1,20)	80 (98,8)

N – Representa o número de indivíduos por variável

4.3 Diagnóstico de alterações nos genes *HBA*: α -talassémia

Como mencionado no capítulo Introdução, a α -talassémia é um potencial modificador genético da gravidade da drepanocitose. Dado este facto, no âmbito do presente trabalho, pretendeu-se realizar um estudo de associação entre a co-herança de α -talassémia e os fenótipos da drepanocitose. A fim de concretizar este objetivo, numa fase inicial foi necessário a deteção da presença das duas deleções mais comuns localizadas nos genes *HBA* (a deleção 3,7 kb e a deleção 4,2 kb) em simultâneo. Os diagnósticos foram realizados após a implementação da metodologia *multiplex gap*-PCR adaptada de Tan *et al.* 2001⁹² e descrita no capítulo de materiais e métodos. Os produtos amplificados através dessa metodologia foram submetidos a eletroforese de modo a confirmar-se o perfil de cada um, pela análise dos tamanhos dos fragmentos amplificados. Um exemplo da

captação visual dos perfis eletroforéticos de seis amostras usadas para a implementação da metodologia são encontrados na Figura 4.4.

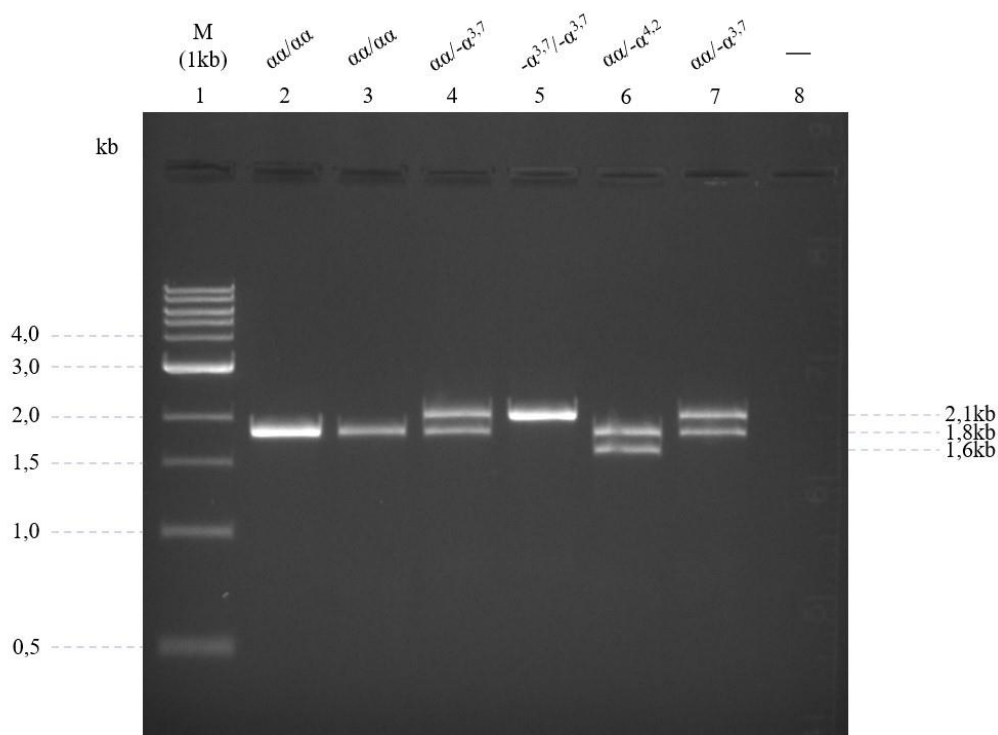


Figura 4.4. Diagnóstico da α -talassémia através do *Multiplex Gap-PCR*. Resultado de um gel de agarose a 1% (p/v) após a eletroforese dos produtos amplificados. Na 1ª posição observa-se o marcador de peso molecular (M); nas posições 2 e 3, encontram-se amostras sem deleção nos genes α ($\alpha\alpha/\alpha\alpha$) com apenas um fragmento de 1,8kb; na 4ª e na 7ª posição constata-se uma heterozigotia para a deleção $-\alpha^{3.7}$ ($\alpha\alpha/-\alpha^{3.7}$) consequentemente à observação de um fragmento de 1,8kb e outro de 2,1kb; a homozigotia para a deleção $-\alpha^{3.7}$ ($-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$) é observada na 5ª posição com a visualização de um fragmento de 2,1kb; na 6ª posição encontra-se uma heterozigotia para a deleção $-\alpha^{4.2}$ ($\alpha\alpha/-\alpha^{4.2}$) onde se visualizam 2 fragmentos de 1,8 e 1,6 kb. Na 8ª posição encontra-se o controle negativo.

Do universo das 81 crianças, 46 (56,79%) indivíduos revelaram ausência de α -talassémia, ou seja, um genótipo normal ($\alpha\alpha/\alpha\alpha$). Dos 46 indivíduos, 25 correspondem ao sexo masculino e 21 ao sexo feminino. No que diz respeito a indivíduos heterozigóticos ($\alpha\alpha/-\alpha^{3.7}$), foram detetadas 30 (37,04%) crianças, sendo 16 do sexo masculino e 14 do sexo feminino. Foi ainda verificado que cinco (6,17%) crianças eram homozigóticas para a deleção ($-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$), sendo três do sexo masculino e duas do sexo feminino. No estudo de diagnóstico da α -talassémia, foi ainda constatado que das 81 crianças, nenhuma apresenta heterozigotia ou homozigotia da deleção $-\alpha^{4.2}$ (Figura 4.5).

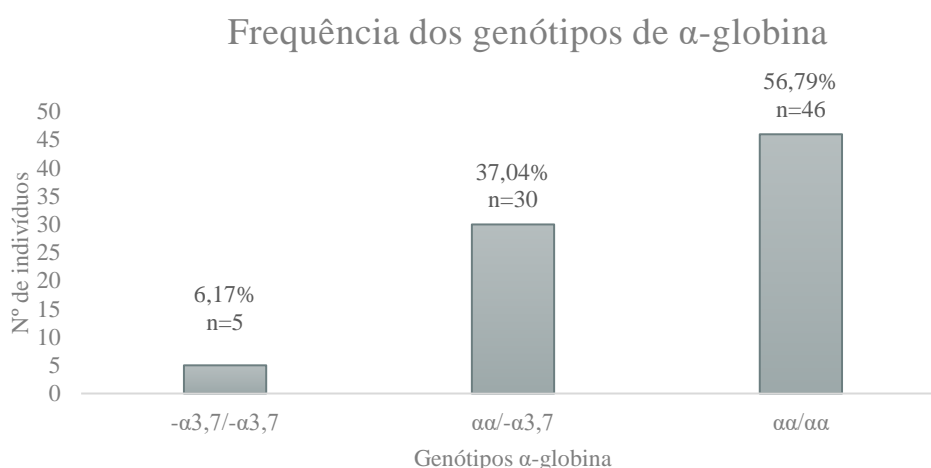


Figura 4.5. Frequência dos genótipos de α -globina detetada nas 81 crianças com drepanocitose. Observa-se cinco (6,17%) crianças homocigóticas para a deleção ($-\alpha^{3,7}/-\alpha^{3,7}$), 30 (37,04%) crianças heterocigóticas ($\alpha/\alpha^{3,7}$), e 46 (56,79%) crianças com o genótipo normal (α/α).

A menor prevalência da deleção $\alpha^{4,2}$ em comparação com a deleção $\alpha^{3,7}$ é uma observação coerente com a literatura disponível, embora estes estudos tenham sido realizados na população em geral: Peres *et al.*, 1995¹⁰⁴ observaram que em Portugal, numa amostra de sangues do cordão umbilical de 100 indivíduos, 86% correspondia a um genótipo α/α , 7% ao genótipo $\alpha/\alpha^{3,7}$ e 3% ao $\alpha/\alpha^{4,2}$. No Brasil¹⁰⁵, verificou-se 86,84% do genótipo α/α , 12,36% do $\alpha/\alpha^{3,7}$, 0,46% do $-\alpha^{3,7}/-\alpha^{3,7}$ e 0,35% do genótipo $\alpha/\alpha^{4,2}$. Outras prevalências genotípicas semelhantes foram relatadas: na China ($\alpha/\alpha^{3,7}$ correspondeu a 35,12% e $\alpha/\alpha^{4,2}$ a 6,93%)¹⁰⁶, Paquistão ($\alpha/\alpha^{3,7}$ representou 22,30% e $\alpha/\alpha^{4,2}$, 1,70%)¹⁰⁷, Camboja ($\alpha/\alpha^{3,7}$ correspondeu a 23,73% e $\alpha/\alpha^{4,2}$ a 0,80%)¹⁰⁸, Índia ($\alpha/\alpha^{3,7}$ foi relacionado a 24,92% da amostra e $\alpha/\alpha^{4,2}$ a 3,03%)¹⁰⁹ e no Barém ($\alpha/\alpha^{3,7}$ correspondeu a 14,79% e $\alpha/\alpha^{4,2}$ a 0,59%)¹¹⁰. Consequentemente, tendo esta deleção de 4,2kb uma frequência relativamente baixa, é plausível que numa população da dimensão do presente estudo não tenha sido observada.

Analogamente, para suportar as evidências obtidas quanto à prevalência da deleção $\alpha^{3,7}$ na nossa população de crianças com drepanocitose, recorreu-se uma vez mais à literatura disponível de estudos realizados que associam a co-herança da drepanocitose e da α -talassémia. Foi reportado na República dos Camarões uma prevalência da homocigotia para a deleção $-\alpha^{3,7}$ de 6,80%¹¹¹ muito equiparada aos resultados obtidos neste trabalho, no Barém 5,33%¹¹⁰, no Irão 4,76%¹¹². Em contrapartida, esta prevalência

foi mais reduzida no Brasil 1,44%¹¹³ e no Senegal 2,30%¹¹⁴ e mais elevada nos estudos realizados com crianças angolanas 12,50%¹¹⁵.

Para verificar se a proporção dos três genótipos de α -globina que encontramos é semelhante à esperada aplicou-se a determinação do Equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE). A aplicação do conceito do princípio do HWE estabelece uma referência que possibilita estimar e detectar fatores relacionados com o enviesamento de uma amostragem populacional. O teorema tem como postulado o equilíbrio genotípico de uma população quando nenhuma mudança ocorre. Assim, na existência de uma alteração (como seleção natural e artificial, mutação, acasalamento seletivo, migração, endogamia e amostragem aleatória) origina-se um desequilíbrio que pode ser detetável e estimado^{116,117}. Dado a importância deste teste, foi inquerido se a população em estudo se encontrava em equilíbrio segundo o HWE. Esse mesmo teste foi realizado sempre que possível nos estudos subsequentes com 95% de significância. Os resultados estão em conformidade com o HWE, $\chi^2_{(1, N=81)} = 0,001$; $p = 0,97$. Como p é maior do que 0,05 podemos concluir que esta população se encontra em equilíbrio de HW para os genótipos de α -globina.

4.3.1 Associação da α -talassémia com a gravidade da drepanocitose

Tendo em conta os estudos de associação, ao serem comparados os valores médios dos parâmetros hematológicos e bioquímicos dos indivíduos que apresentam a deleção $\alpha^{3,7}$, em heterozigotia ou em homozigotia, com os indivíduos que carecem dessa deleção (genótipo *wild-type*), observa-se que a co-herança de α -talassémia com a drepanocitose se traduz num efeito benéfico, sobretudo ao nível do grau de hemólise, mas também ao nível da anemia, como pode ser verificado na Tabela 4.5 e discutido seguidamente.

Tabela 4.5. Associação entre o fenótipo hematológico e bioquímico e os genótipos de α -globina

Variáveis	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$		$\alpha\alpha/-\alpha^{3,7} + -\alpha^{3,7}/-\alpha^{3,7}$		p-value
	n	Média ± DP	n	Média ± DP	
Eritrócitos ($10^{12}/L$)	46	2,79 ± 0,33	34	3,38 ± 0,57	<0,001 ²
Hemoglobina (g/dL)	46	7,91 ± 0,97	35	8,05 ± 0,82	0,301 ²
Reticulócitos (%)	46	14,50 ± 5,35	33	9,37 ± 4,10	<0,001 ²
LDH (U/L)	9	796,22 ± 227,52	17	625,59 ± 197,85	0,070 ¹
Bilirrubina total (mg/dL)	44	3,33 ± 1,60	30	2,53 ± 1,47	0,010 ²
VGM (fL)	46	84,18 ± 5,97	34	72,54 ± 7,60	<0,001 ¹
HGM (pg)	46	28,56 ± 2,51	34	24,37 ± 2,78	<0,001 ¹
Hematócrito (%)	46	23,40 ± 2,60	34	24,15 ± 2,47	0,195 ¹
RDW (%)	46	22,36 ± 3,29	34	21,80 ± 2,91	0,430 ¹
Leucócitos ($10^9/L$)	46	13,27 ± 3,89	34	12,18 ± 4,86	0,171 ²
Neutrófilos ($10^9/L$)	46	6,04 ± 2,56	34	6,06 ± 3,64	0,508 ²
Plaquetas ($10^9/L$)	46	432,94 ± 118,44	34	400,41 ± 118,91	0,229 ¹
HbS (%)	13	82,73 ± 6,81	12	81,11 ± 7,89	0,586 ¹
HbF (%)	27	11,13 ± 6,93	19	12,68 ± 7,35	0,482 ²

VGM – Volume globular médio; HGM – Hemoglobina globular média; RDW – Red cell distribution width; HbS – Hemoglobina S; HbF – Hemoglobina fetal; LDH – Lactato desidrogenase

¹Teste-t

²Mann-Whitney

Significância estatística para p-value < 0,05

Quanto ao valor médio da contagem de eritrócitos correspondente aos indivíduos sem deleção equivale a $2,79 \pm 0,33 \times 10^{12}/L$, já no caso indivíduos com a deleção, quer seja em heterozigotia ou em homozigotia, a média dessa contagem equivale a $3,38 \pm 0,57 \times 10^{12}/L$. Daqui se conclui que a presença de α -talassémia melhora significativamente a contagem de eritrócitos nestas crianças.

Os valores médios da concentração de hemoglobina nas crianças que não apresentam a deleção em relação às que a apresentam também demonstram uma tendência para aumento, respetivamente $7,91 \pm 0,97$ g/dL vs. $8,05 \pm 0,82$ g/dL, embora a diferença não apresente significância estatística. Uma vez que segundo a OMS a anemia é “uma condição em que o número de glóbulos vermelhos ou a concentração de hemoglobina dentro deles é menor do que o normal”¹¹⁸, estes fatores determinam a gravidade da anemia. De acordo com essa perspetiva, e avaliando a gravidade da anemia com base na Tabela 4.3 apresentada anteriormente, faz-se notar que a concentração média de hemoglobina do grupo com deleção enquadra-se na anemia moderada, no entanto, o grupo sem deleção, ainda que por uma pouca diferença, está enquadrado na anemia severa.

O efeito benéfico da co-herança da α -talassémia com a drepanocitose pode-se ainda constatar através dos biomarcadores séricos de hemólise: contagem de reticulócitos, bilirrubina total e os níveis de LDH. No caso dos níveis de bilirrubina total e de contagem

de reticulócitos é notada uma diminuição estatisticamente significativa para ambos os parâmetros no grupo que tem α -talassémia. Quanto aos níveis de LDH, embora a diferença não atinja significado estatístico, é notada uma forte tendência de diminuição no grupo que tem α -talassémia. Assim, podemos concluir que há uma redução da taxa hemolítica nos indivíduos com a deleção comparativamente aos indivíduos sem deleção. Como relatado no capítulo da Introdução, uma hemólise intravascular exacerbada liberta a hemoglobina e o grupo heme conduzindo a uma redução da biodisponibilidade de NO. Por sua vez, esta redução de NO favorece o aumento plaquetário, o que poderá ser uma explicação plausível para o aumento plaquetário nos indivíduos sem deleção quando comparado com os indivíduos com deleção.

Na mesma tabela observa-se outros fatores que possivelmente sofreram também a influência do genótipo *HBA*. A média da percentagem do hematócrito demonstra uma coerência nos parâmetros acima citados, uma vez que a diminuição da hemólise vai consequentemente aumentar o volume de massa eritróide numa amostra sanguínea; deste modo é natural que o valor médio do hematócrito seja mais elevado no grupo das crianças que apresentam a deleção ($24,15 \pm 2,47\%$) do que no grupo das crianças que não apresentam a deleção ($23,39 \pm 2,60\%$). Relativamente ao RDW, a média deste parâmetro para os indivíduos com deleção é comparativamente inferior à média dos indivíduos sem deleção, demonstrando desta forma que as crianças com a deleção apresentam uma maior homogeneidade da população eritróide.

A avaliação dos dados do leucograma exhibe um valor médio que corresponde a uma leucocitose em ambos os grupos, observação que não é surpreendente uma vez que os indivíduos drepanocíticos manifestam um número basal de leucócitos elevado devido aos danos tecidulares causados pela vaso-oclusão e subsequente resposta inflamatória. Ainda assim, pode ser notado que a contagem média dos leucócitos nos indivíduos com deleção é inferior à dos indivíduos sem deleção ($12,18 \pm 4,86 \times 10^9/L$ vs. $13,27 \pm 3,89 \times 10^9/L$). Como já relatado, os neutrófilos desempenham um papel crucial no desenvolvimento das crises vaso-oclusivas. Perante a comparação dos dois grupos, é visível que a diferença dos valores médios referentes a este parâmetro é diminuta, o que poderá dever-se ao facto dos dados terem sido recolhidos em *steady-state*.

A anemia hemolítica normocítica e normocrómica é geralmente comum em indivíduos drepanocíticos, contudo, quando esta patologia é acompanhada com α -talassémia, verifica-se uma diminuição do VGM e do HGM, originando uma anemia

microcítica e hipocrômica. Ao analisar-se os valores destes parâmetros em ambos os grupos, é notório que as médias obtidas em cada um dos parâmetros vai ao encontro do relato supracitado. Para interpretar a possível causa desse acontecimento é necessário lembrar que os indivíduos drepanocíticos que não apresentam α -talassémia produzem α -globina nos níveis normais, pelo que essas vão emparelhar-se com as β^S -globinas, fazendo com que os eritrócitos se manifestem com uma coloração e um tamanho normal. Por outro lado, indivíduos com a deleção têm redução da α -globina o que limita a formação de HbS no interior nos eritrócitos, pelo que retarda a hemólise prematura e permite o melhor desenvolvimento dos eritrócitos, fundamentando a maior quantidade de eritrócitos nos indivíduos com α -talassémia e a menor quantidade de reticulócitos no mesmo grupo.

No que concerne à concentração de HbF e de HbS, as diferenças dos valores médios entre os grupos foram mínimas.

Sintetizando os resultados deste estudo, a deleção de 3,7 kb em α -globina, em homozigotia ou heterozigotia, aparenta estar relacionada com alterações hematológicas vantajosas que poderão determinar um curso da doença mais suave nas crianças com drepanocitose. Assim, de modo a explorar a possível associação da α -talassémia com um fenótipo mais brando da drepanocitose, analisou-se também as informações clínicas com base no genótipo *HBA* apresentado. Os resultados dessa confrontação entre genótipo / fenótipos clínicos são apresentados na Tabela 4.6.

Tabela 4.6. Associação entre o fenótipo clínico e os genótipos de α -globina

Variáveis clínicas	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$			$\alpha\alpha/\alpha^{-3,7} + \alpha^{-3,7}/\alpha^{-3,7}$			<i>p-value</i>
	n	Sim (%)	Não (%)	n	Sim (%)	Não (%)	
Icterícia	46	37 (80,43)	9 (19,57)	33	23 (69,70)	10 (30,30)	0,271
Litíase biliar	36	16 (44,44)	20 (55,56)	23	10 (43,48)	13 (56,52)	0,942
Esplenomegalia	44	5 (11,36)	39 (88,64)	31	6 (19,35)	25 (80,65)	0,335
Hepatomegalia	42	15 (35,71)	27 (64,29)	32	9 (28,12)	23 (71,88)	0,490
Doença pulmonar crônica	46	0 (0,00)	46 (100,00)	34	2 (5,88)	32 (94,12)	0,096
Hipertensão pulmonar	45	0 (0,00)	45 (100,00)	34	0 (0,00)	34 (100,00)	-
Cardiopatia	46	46 (100,00)	0 (0,00)	35	35 (100,00)	0 (0,00)	-
Sopros cardíacos	46	46 (100,00)	0 (0,00)	35	35 (100,00)	0 (0,00)	-

Outra cardiopatia	38	28 (73,68)	10 (26,32)	21	14 (66,67)	7 (33,33)	0,569
Êxito fatal	46	0 (0,00)	46 (100,00)	35	1 (2,86)	34 (97,14)	0,249

Teste χ^2
Significância estatística para $p\text{-value} < 0,05$

Como relatado anteriormente, a drepanocitose é uma patologia multissistêmica cujas manifestações se iniciam ainda numa fase prematura da vida e onde as comorbidades podem ser diversificadas de indivíduo para indivíduo. Na Tabela 4.4. foi possível verificar que todas as crianças do estudo apresentaram incidentes evolutivos. Nessa tabela, é possível também constatar que as cardiopatias são comorbidades muito associadas à drepanocitose uma vez que todas as crianças participantes do estudo apresentam alguma cardiopatia, nomeadamente sopro cardíaco. Uma vez que, um dos critérios para a participação no estudo era uma idade mínima de 3 anos, então, subentende-se que aparentemente o coração é dos primeiros órgãos a sofrer as consequências da patologia. O coração tem uma função contínua e devido à anemia crônica, a capacidade de transporte do oxigênio é limitada. De maneira a compensar essa limitação, há um aumento do débito cardíaco assim como uma dilatação vascular periférica. Essa sobrecarga crônica direciona para uma hipertrofia que no caso da drepanocitose pode levar ao aumento do retorno venoso. A drepanocitose pode desencadear outras manifestações nefastas relacionadas com o coração¹¹⁹. Neste estudo, 73,68% dos participantes sem deleção α -talassêmica comporta alguma outra cardiopatia enquanto que esta é observada em 66,67% dos indivíduos com deleção α -talassêmica. Essa diferença, ainda que sem significado estatístico, poderá indicar que a presença da deleção α -talassêmica em crianças com drepanocitose possa retardar o aparecimento de algumas cardiopatias, possivelmente devido à melhor capacidade de desenvolvimento dos eritrócitos e do seu aumento em número, o que, conseqüentemente, permite um aumento da concentração de hemoglobina e da capacidade de transporte de oxigênio diminuindo a gravidade da hipoxia nos tecidos.

Uma das causas do desenvolvimento de icterícia é a elevada destruição de eritrócitos, característica de anemias hemolíticas. A destruição dessas células liberta a bilirrubina total para a corrente sanguínea provocando icterícia. Analisando a Tabela 4.6. observa-se que, ainda que sem significado estatístico, a frequência relativa desta manifestação de anemia, é superior no grupo de crianças sem deleção α -talassêmica em

comparação ao do grupo de crianças com deleção. A anemia drepanocítica é uma anemia hemolítica, pelo que a observação de icterícia em ambos os grupos é plausível, no entanto, como verificado no estudo do fenótipo hematológico e bioquímico, o grupo sem deleção apresentou uma maior taxa de hemólise que, como consequência, conduziu ao aumento dos níveis de bilirrubina total, o principal parâmetro que origina icterícia.

Outras complicações comumente observadas em doentes drepanocíticos foram também manifestadas nos dois grupos em estudo neste tópico, no entanto, complicações como litíase biliar e hepatomegalia apresentam uma maior frequência relativa no grupo de crianças sem deleção α -talassémica, apesar da diferença não atingir significado estatístico. Ambas as complicações poderão resultar da hemólise descomedida e das lesões resultantes da obstrução dos vasos. Mas, além disso, a hepatomegalia poderá também estar relacionada com um elevado uso de medicação com alguma toxicidade para o fígado. Foi verificado que no grupo sem deleção α -talassémica há uma tendência para um maior aumento de leucócitos e plaquetas, ambos fatores são contribuintes para as crises vaso-oclusivas, o que poderá aumentar a necessidade de analgésicos.

Já a esplenomegalia foi observada em 19,35% dos indivíduos com deleção α -talassémica e em 11,36% dos indivíduos sem deleção, no entanto esta diferença não apresenta significado estatístico. Como relatado anteriormente, o baço é responsável pela produção de anticorpos, uma vez que o grupo com deleção α -talassémica apresenta uma maior frequência relativa de disfunção do baço, possivelmente encontram-se mais vulneráveis a infeções pulmonares, podendo estas causar lesões permanentes. Assim, coerentemente com esta hipótese, foi verificado doença pulmonar crónica em 5,88% do grupo com deleção, mas não se constatou nenhum caso nos indivíduos sem deleção.

Não foram registados casos de hipertensão pulmonar em nenhum dos grupos.

Na população estudada, foi verificada 1 (2,86%) fatalidade numa criança pertencente ao grupo contendo a deleção $\alpha 3,7$. A criança em questão apresentava o genótipo $-\alpha 3,7/-\alpha 3,7$, manifestava cardiopatias e hepatomegalia tendo falecido devido a uma insuficiência cardíaca.

Pelo acima exposto, é perfeitamente perceptível que o surgimento de outras patologias decursivas da drepanocitose é um acontecimento intrínseco desta mutação e pode afetar uma vasta quantidade dos órgãos humanos¹¹¹. Apesar desse conhecimento, as patologias associadas podem estar também relacionadas com outros fatores genéticos e ambientais

e por este motivo podem ser diversas, afetar cada indivíduo de maneira diferente e/ou em fases diferentes da linha da vida¹¹¹.

Perante toda a avaliação que teve como intuito investigar uma possível associação da α -talassémia com um fenótipo mais brando da drepanocitose, é notório que do ponto de vista fisiológico, a α -talassémia aparentemente reduz o impacto severo da anemia drepanocítica. Nesta associação verificamos um benefício nos fenótipos hematológico e bioquímico no grupo que apresenta a deleção. Apesar de não ser abordado no presente estudo, este benefício poderá, provavelmente, atrasar a idade de diagnóstico e melhorar a sobrevivência de pacientes drepanocíticos, retardando ou até impedindo o aparecimento das comorbidades associadas à drepanocitose^{87,111}. Ainda assim, para alguns indivíduos a co-herança de α -talassémia não foi suficiente para que as complicações clínicas deixassem de ser reportadas numa fase tão prematura das suas vidas. Ainda que as complicações clínicas sejam verificadas em ambos os grupos, tal como outros autores que demonstraram haver melhorias significativas de algumas complicações clínicas específicas pela co-herança de talassémia^{87,110,111,113}, através deste estudo foi possível relatar uma tendência na redução do número de casos da maioria das complicações clínicas mencionadas na Tabela 4.6.

4.4 Polimorfismo no gene *HBG2* - rs7482144 (C>T)

A análise do polimorfismo rs7482144 foi explorada por meio da metodologia PCR-RFLP. A metodologia consiste essencialmente em duas etapas: amplificação do promotor do gene *HBG2* e restrição por meio da enzima *Xmn* I. Na primeira etapa obtém-se um fragmento de 677 pb cujo sucesso de amplificação foi visualizado através de eletroforese (como exemplificado na Figura 4.6). A segunda etapa corresponde à restrição enzimática dos fragmentos amplificados: no caso do alelo T há uma hidrólise e obtêm-se dois fragmentos de 462 e 215pb. No caso do alelo C, não há restrição pelo que o fragmento continua a ser de 677 pb. Na Figura 4.7. está apresentado o registo fotográfico dos resultados obtidos pela aplicação desta metodologia a algumas das amostras em estudo.

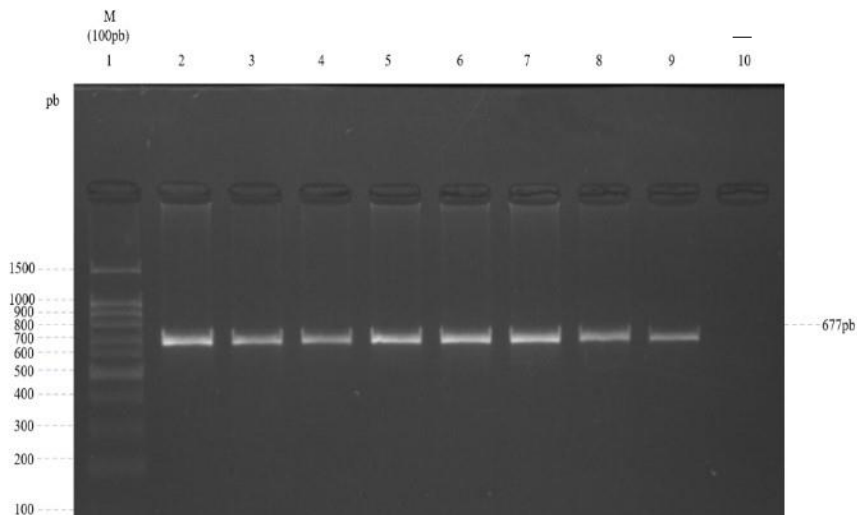


Figura 4.6. Visualização de um gel após separação eletroforética dos produtos de amplificação por PCR do promotor do gene *HBG2*. A revelação do gel de agarose 2% (p/v) apresenta na posição 1 o marcador de peso molecular de 100pb (M). Na posição 2 a 9, verifica-se o sucesso da amplificação de oito amostras pela visualização de um fragmento de 677pb. A posição 10 corresponde ao controlo negativo do PCR (-).

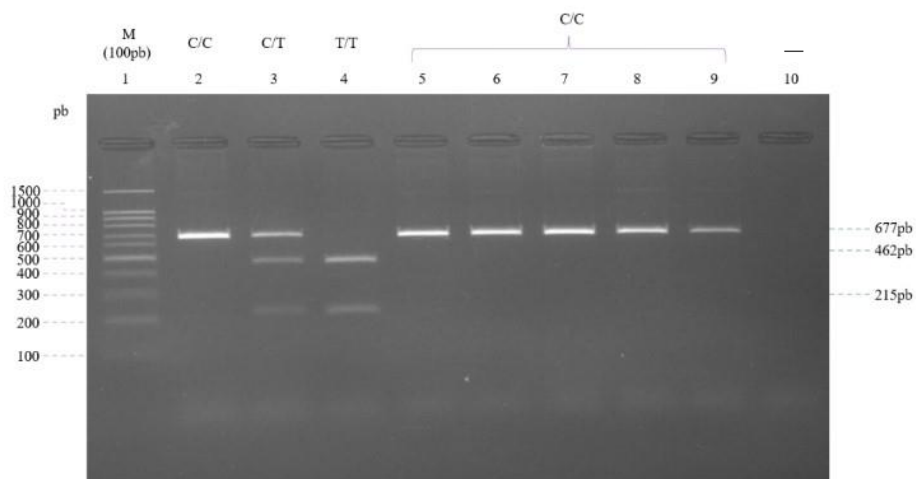


Figura 4.7. Registo fotográfico de um gel após separação eletroforética dos produtos da restrição enzimática do promotor do gene *HBG2* com o enzima *Xmn I*. A revelação do gel de agarose 2% (p/v) apresenta na posição 1 o marcador de peso molecular de 100pb (M). Na posição 2, observa-se a presença do alelo C em homocigotia, com apenas um fragmento do tamanho original (677pb) indicando que não ocorreu digestão. A posição 3, corresponde a uma heterocigotia C/T, verificando-se a restrição do alelo T, sendo este fragmentado (462 e 215pb) e um fragmento de tamanho original não digerido. A posição 4 representa uma amostra homocigótica T/T apresentando apenas dois fragmentos que correspondem à restrição dos dois alelos. Da posição 5 à 9 observam-se amostras de indivíduos homocigóticos para o alelo C. A última posição corresponde ao controlo negativo (-).

O estudo do SNP rs7482144 revelou que das 81 crianças analisadas, 65 (80,25%) apresentam homozigotia para o alelo C. Por outro lado, tanto a homozigotia para o alelo T, como a heterozigotia C/T, foram diagnosticadas em oito indivíduos o que representa, para cada caso, 9,88% da amostra (Figura 4.8.).

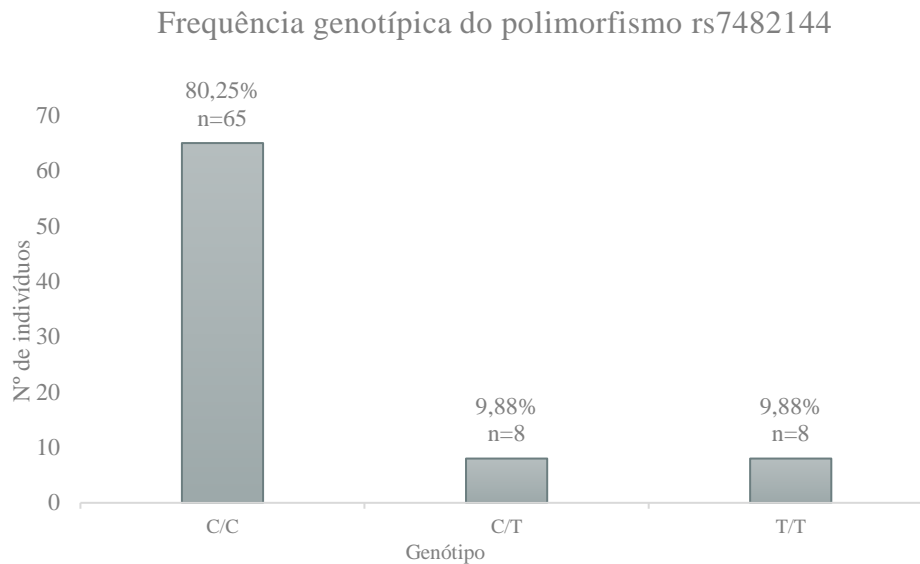


Figura 4.8. Frequência dos genótipos do polimorfismo rs7482144 no gene *HBG2*. Verifica-se 65 (80,25%) crianças homozigóticas para o alelo C, oito (9,88%) crianças heterozigóticas e oito (9,88%) crianças homozigóticas para o alelo T.

As frequências genotípicas encontradas para o SNP 7482144 não estão em HWE, $\chi^2_{(1, N = 81)} = 30,01$; $p = 3,04 \times 10^{-07}$. Pela observação das frequências genotípicas parece haver um número reduzido de genótipos heterozigóticos em relação ao esperado. Essa carência em genótipos heterozigóticos fica por explicar. No entanto, a análise das frequências alélicas revelou-se diferente. Na nossa população em estudo, a frequência alélica do alelo C (alelo nativo) é de 85,2% e do alelo variante T é de 14,8%. A frequência alélica da população em estudo foi comparada com a população africana do projeto “1000 genomes project”, uma vez que as crianças envolvidas são maioritariamente de origem africana. Verificámos que a frequência alélica do alelo C do SNP rs7482144 na nossa população é bastante semelhante ao descrito para a população africana em geral analisada no “1000 genomes project”, respetivamente, 85% versus 86%. Do mesmo modo, a frequência do alelo T na nossa população é muito semelhante à descrita para a população africana em geral (respetivamente, 15% e 14%). Assim, embora as frequências

genotípicas se mostrem diferentes do esperado as frequências alélicas são semelhantes ao esperado.

4.4.1 Estudos de associação do polimorfismo rs7482144 com a gravidade da drepanocitose

A alteração rs7482144 C>T tem sido frequentemente associada à expressão aumentada do gene G_{γ} -globina (*HBG2*), induzindo um aumento dos níveis de HbF em indivíduos com drepanocitose. A Tabela 4.7. expõe os resultados obtidos quando analisados perante um modelo dominante, delimitado pelo grupo de doentes que possuem a alteração em homozigotia ou em heterozigotia, e pelo grupo de doentes que apresenta o genótipo *wild type*. O resultado deste estudo de associação é coerente com o reportado na literatura, demonstrando-se aqui também que a presença do alelo de menor frequência (T) tem uma contribuição importante no aumento da HbF. O grupo que apresenta a alteração demonstra valores mais elevados ($15,12 \pm 8,44\%$) do que o grupo *wild type* ($10,95 \pm 6,57\%$). É bem conhecido o valor preventivo de um nível elevado de HbF uma vez que esta não polimeriza juntamente com a HbS.

Tabela 4.7. Associação entre o fenótipo hematológico e hemolítico e o SNP rs7482144 do gene *HBG2* segundo o modelo dominante

Variáveis	CC		CT+TT		p-value
	n	Média ± DP	n	Média ± DP	
Hemoglobina (g/dL)	65	7,91 ± 0,83	16	8,23 ± 1,14	0,333 ²
Reticulócitos (%)	64	11,92 ± 5,09	15	14,26 ± 6,73	0,250 ²
LDH (U/L)	20	753,30 ± 216,24	6	683,35 ± 283,47	0,523 ¹
Bilirrubina total (mg/dL)	60	2,99 ± 1,55	14	3,08 ± 1,80	0,978 ²
HbS (%)	22	82,63 ± 7,20	3	76,97 ± 6,50	0,210 ¹
HbF (%)	37	10,95 ± 6,57	9	15,12 ± 8,44	0,113 ²

LDH – Lactato desidrogenase; HbS – Hemoglobina S; HbF – Hemoglobina fetal

¹Teste-t

²Mann-Whitney

Significância estatística para p-value < 0,05

O polimorfismo parece ter um efeito modelador ao nível do aumento da HbF, embora sem significância estatística, mas também consequentemente, como era de se

esperar, quanto à diminuição da concentração de HbS, uma vez que as hemoglobinas são quantificadas em porcentagem. O grupo com o alelo T apresenta uma porcentagem média de HbS de $76,97 \pm 6,50\%$, realçando uma diferença quando comparado com a porcentagem média de $82,63 \pm 7,20\%$ do grupo sem a alteração. Sendo a HbS a hemoglobina responsável pela polimerização e falciformização dos eritrócitos, a sua diminuição favorece a redução da polimerização e conseqüentemente o decréscimo da taxa de hemólise. Dada esta observação e, de forma a consolidar o presente estudo, foram analisados os indicadores da taxa de hemólise. O grupo de crianças sem a alteração genética no referido SNP manifestou níveis de LDH enquadrados numa taxa de hemólise mais elevada quando comparado com o grupo de crianças com a alteração, contudo, a contagem de reticulócitos e a bilirrubina total são ambas inferiores no grupo sem a alteração.

A concentração de hemoglobina é, como já mencionado, um valor que determina a gravidade da anemia e o decurso da drepanocitose. No presente estudo, o grupo de indivíduos sem a alteração genética no referido SNP manifestou um valor médio de hemoglobina de $7,91 \pm 0,83$ g/dL e o grupo de indivíduos com a presença do alelo T, apresentou uma concentração de hemoglobina média de $8,23 \pm 1,14$ g/dL. Os valores apresentados são determinantes na classificação da gravidade da anemia. Consultando a Tabela 4.3., constata-se que o grupo das crianças sem a alteração genética no referido SNP é enquadrado nos limites da anemia grave e o grupo com a alteração enquadra-se nos limites da anemia moderada. Os valores mais elevados de hemoglobina no grupo de indivíduos com a variante genética, em homocigotia ou em heterocigotia, sugerem uma relação com a presença da variante T.

Numa visão geral, a variante T do SNP rs7482144 além de demonstrar elevar os níveis de HbF, aparenta ainda reduzir a taxa de hemólise e aumentar os níveis de hemoglobina. Todos esses fatores são importantes contributos para amenizar a anemia severa em crianças drepanocíticas, podendo melhorar a qualidade de vida e diminuição das crises das mesmas.

Analisando o modelo codominante (Tabela 4.8.) e a Figura 4.9., torna-se mais evidente o efeito do alelo T na concentração da HbF bem como na concentração da hemoglobina. A concentração de HbF aumentou de forma exponencial com a quantidade de alelos T presentes. De forma mais subtil, o mesmo efeito foi verificado em relação à

hemoglobina. Apesar do grupo com o genótipo heterozigótico CT e o homozigótico para a alteração TT serem compostos por uma quantidade reduzida de indivíduos, é possível obter-se uma noção da importância da homozigotia deste alelo em doentes drepanocíticos.

Tabela 4.8. Associação entre o fenótipo hematológico e hemolítico e o SNP rs7482144 do gene *HBG2* segundo o modelo codominante

Variáveis	CC		CT		TT		p-value
	n	Média ± DP	n	Média ± DP	n	Média ± DP	
Hemoglobina (g/dL)	65	7,91 ± 0,83	8	8,20 ± 1,07	8	8,25 ± 1,28	0,457 ¹
HbF (%)	37	10,95 ± 6,57	4	13,25 ± 9,80	5	16,62 ± 8,02	0,315 ²

HbF – Hemoglobina fetal

¹ANOVA

²Kruskal-Wallis

Significância estatística para *p-value* < 0,05

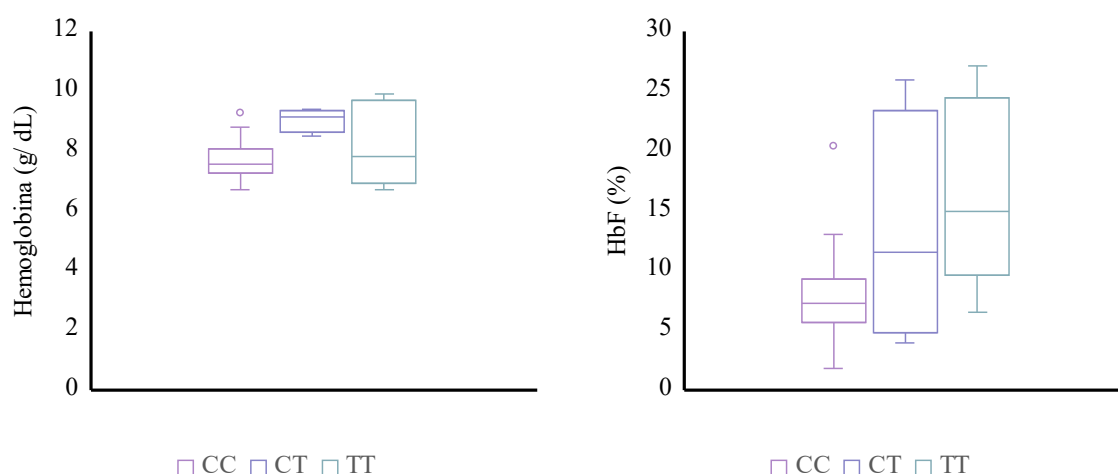


Figura 4.9. Concentração de hemoglobina e percentagem de HbF em função do genótipo em rs7482144.

Na literatura, alguns estudos associam a alteração rs7482144 C>T à diminuição de crises, uma vez que a falciformização dos eritrócitos é reduzida devido ao aumento da concentração da HbF¹²⁰⁻¹²². Apesar desta informação em concreto não estar detalhada na base de dados fornecida, observou-se neste estudo outros fatores que podem permitir concluir que a presença do alelo T está associada à existência de um percurso clínico mais moderado. A Tabela 4.9. demonstra que as frequências relativas das consequências causadas pela drepanocitose tendem a ser maiores no grupo *wild type* comparativamente ao grupo com o alelo T, com exceção das cardiopatias.

Tabela 4.9. Associação entre o fenótipo clínico e o SNP rs7482144 do gene *HBG2*

Variáveis clínicas	CC			CT+TT			<i>p-value</i>
	n	Sim (%)	Não (%)	n	Sim (%)	Não (%)	
Icterícia	64	49 (76,56)	15 (23,44)	15	11 (73,33)	4 (26,67)	0,792
Litíase biliar	48	22 (45,83)	26 (54,17)	11	4 (36,36)	7 (63,64)	0,568
Esplenomegalia	60	10 (16,67)	50 (83,33)	15	1 (6,67)	14 (93,33)	0,327
Hepatomegalia	61	22 (36,07)	39 (63,93)	13	2 (15,38)	11 (84,62)	0,148
Doença pulmonar crônica	65	2 (3,1)	63 (96,92)	15	0 (0,00)	15 (100,00)	0,491
Hipertensão pulmonar	64	0 (0,00)	64 (100,00)	15	0 (0,00)	15 (100,00)	-
Cardiopatía	65	65 (100,00)	0 (0,00)	16	16 (100,00)	0 (0,00)	-
Sopros cardíacos	65	65 (100,00)	0 (0,00)	16	16 (100,00)	0 (0,00)	-
Outra cardiopatía	50	34 (68,00)	16 (32,00)	9	8 (88,89)	1 (11,11)	0,203
Êxito fatal	65	1 (1,50)	64 (98,46)	16	0 (0,00)	16 (100,00)	0,618

Teste χ^2
Significância estatística para *p-value* < 0,05

Uma vez que o local rs7482144 localizado no promotor do gene *HBG2* faz parte dos locais que determinam o haplótipo associado à drepanocitose, esta análise foi o nosso próximo objetivo de estudo.

4.5 Haplótipos no agrupamento génico da β -globina

Os locais polimórficos investigados pela Dra. Andreia Coelho permitiram determinar o perfil do haplótipo no agrupamento génico da β -globina de cada um dos 81 indivíduos, o que resultou em oito perfis distintos. O genótipo Bantu/Bantu foi verificado em 46 crianças, sendo este genótipo o mais predominante na população em estudo e representando 56,79% da amostra. Quanto à frequência alélica, o haplótipo Bantu atingiu 66% dos alelos caracterizados. Os genótipos Benim/Benim e Senegal/Senegal foram observados em oito crianças, 9,88% da amostra. Identificaram-se sete crianças com o genótipo Bantu/Benim, cinco com o genótipo Bantu/Senegal e três com o genótipo Benim/Senegal que representam, respetivamente, 8,64%, 6,17% e 3,70%. Foi ainda constatado quatro indivíduos com heterozigotia de alelos atípicos; três com os genótipos Bantu/Atípico e um com o Benim/Atípico. Nesta população predominante de crianças

afrodescendentes, não foi verificado o haplótipo Árabe-Indiano nem o haplótipo Camarões. Mais detalhes podem ser verificados na Figura 4.10.

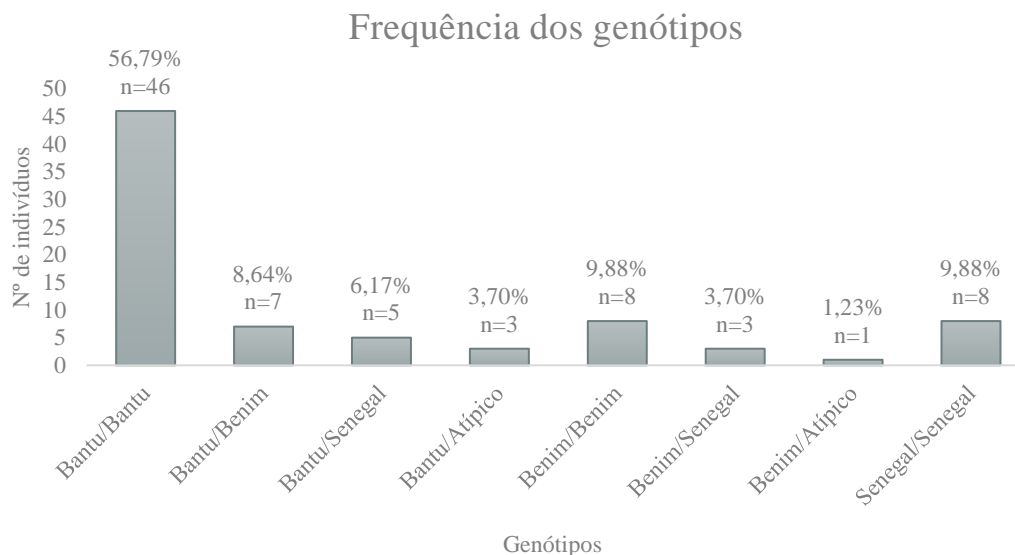


Figura 4.10. Frequência dos genótipos nas crianças participantes do estudo. Na figura constata-se que 46 (56,79%) crianças têm o genótipo Bantu/Bantu, sete (8,64%) crianças têm o genótipo Bantu/Benim, cinco (6,17%) com o genótipo Bantu/Senegal, verifica-se ainda três (3,70%) crianças com os genótipos Bantu/Atípico e Benim/Senegal, oito (9,88%) crianças com os genótipos Benim/Benim e Senegal/Senegal e uma (1,23%) criança com o Benim/Atípico.

Os haplótipos identificados no corrente estudo são comumente verificados em África, local este indicado como a possível origem dos haplótipos Senegal, Benim, Bantu e Camarões⁷⁷. À exceção do haplótipo Camarões, que é observado em grupos étnicos de Camarões¹²³, todos os outros haplótipos africanos foram verificados na população analisada neste estudo, já que a ascendência dessas crianças corresponde a zonas onde esses haplótipos são prevalentes. O haplótipo Árabe-Indiano é prevalente na Ásia, como indicado pelo nome do próprio haplótipo, e na Península Arábica e na Índia⁷⁷, razão pela qual neste estudo, que envolve maioritariamente crianças de origem africana, não se verificou este haplótipo.

A fim de se aprofundar o estudo e investigar a prevalência de cada um dos haplótipos encontrados tendo em conta os países de origem das crianças e dos seus progenitores, analisou-se a ascendência das crianças envolvidas e correlacionou-se com o genótipo que cada uma delas apresenta (Tabela 4.10).

Tabela 4.10. Frequência dos genótipos com base na naturalidade dos progenitores das crianças estudadas

Genótipos	Naturalidade dos progenitores dos participantes									
	PT/PT n (%)	AO/AO n (%)	CV/AO n (%)	CV/CV n (%)	ST/AO n (%)	ST/ST n (%)	GN/AO n (%)	GN/GN n (%)	SN/AO n (%)	SN/SN n (%)
BAN/BAN	-	42 (51,85)	1 (1,23)	-	-	1 (1,23)	-	-	2 (2,47)	-
BAN/BEN	-	3 (3,70)	-	-	2 (2,47)	2 (2,47)	-	-	-	-
BAN/SEN	1 (1,23)	2 (2,47)	-	-	-	-	-	1 (1,23)	-	-
BAN/Atípico	-	2 (2,47)	-	1 (1,23)	-	-	-	-	-	-
BEN/Atípico	-	1 (1,23)	-	-	-	-	-	-	-	-
BEN/BEN	-	-	-	-	-	7 (8,64)	-	-	-	1 (1,23)
BEN/SEN	-	-	-	-	-	-	-	3 (3,70)	-	-
SEN/SEN	-	-	-	1 (1,23)	-	-	1 (1,23)	6 (7,41)	-	-

BAN – Haplótipo Bantu; **BEN** – Haplótipo Benim; **SEN** – Haplótipo Senegal

PT – Portugal; **AO** – Angola; **CV** – Cabo Verde; **ST** – São Tomé; **GN** – Guiné; **SN** – Senegal

O haplótipo Bantu, em homozigotia ou em heterozigotia, foi o mais observado nas crianças que têm pelo menos um progenitor de naturalidade angolana. Para além da população angolana ser a mais representada nesta amostra, Angola é também um dos países integrantes da República Centro-Africana, área onde o grupo etnolinguístico Bantu é predominante. Deste modo, não é surpreendente a relação entre a quantidade de indivíduos de ascendência angolana detentores desde haplótipo. O grupo de ascendência angolana exibiu ainda a maior diversidade de haplótipos, o que poderá dever-se à dimensão da população angolana participante no estudo, mas também poderá estar relacionado com a migração dos povos africanos.

No nosso estudo foi verificada uma associação entre o haplótipo Benim e a ascendência são-tomense. Foi também notada a presença dos haplótipos Bantu e Benim no grupo de progenitores são-tomenses. São Tomé é uma ilha africana que historicamente esteve fortemente envolvida no comércio de escravos provenientes de diversos pontos de África. Desta forma, São Tomé tem um forte património genético caracterizado pela sua variedade, demonstrando a sua ligação com o povo Benim e o povo Bantu.

Encontrou-se nas crianças de ascendência guineense a maioria dos cromossomas com o haplótipo Senegal. Geograficamente, o território guineense faz fronteira com o Senegal, facilitando os eventos migratórios entre a população senegalesa e a população guineense, justificando-se desta forma a observação apresentada.

4.5.1 Estudos de associação dos haplótipos com a gravidade da drepanocitose

Ainda que alguns haplótipos se encontrem em minoria populacional, é possível investigar as consequências, sejam elas positivas ou negativas, destes padrões de regiões polimórficas do agrupamento génico da β -globina. A Tabela 4.11. apresenta os resultados da análise dos parâmetros hematológicos e bioquímicos em relação aos haplótipos.

Tabela 4.11. Associação entre o fenótipo hematológico e bioquímico e os diferentes genótipos do agrupamento génico da β -globina

Variáveis	Bantu/Bantu		Genótipo Benim/Benim		Senegal/Senegal		<i>p-value</i>
	n	Média \pm DP	n	Média \pm DP	n	Média \pm DP	
Eritrócitos ($\times 10^{12}/L$)	46	3,13 \pm 0,59	8	2,81 \pm 0,30	8	3,14 \pm 0,63	0,270 ²
Hemoglobina (g/dL)	46	7,85 \pm 0,81	8	8,15 \pm 0,81	8	8,25 \pm 1,28	0,592 ²
Reticulócitos (%)	45	11,43 \pm 5,02	8	12,20 \pm 4,79	8	12,04 \pm 5,80	0,897 ¹
LDH (U/L)	15	712,00 \pm 194,98	2	799,50 \pm 72,83	1	500,50	-
Bilirrubina total (mg/dL)	43	2,87 \pm 1,52	7	3,69 \pm 1,74	7	3,27 \pm 2,43	0,463 ²
VGM (fL)	46	76,46 \pm 9,22	8	85,56 \pm 4,57	8	79,13 \pm 10,37	0,033 ¹
HGM (pg)	46	25,68 \pm 3,48	8	29,29 \pm 1,21	8	26,88 \pm 3,71	0,021 ¹
Hematócrito (%)	46	23,50 \pm 2,54	8	23,86 \pm 2,13	8	24,29 \pm 3,26	0,712 ¹
Leucócitos ($10^9/L$)	46	12,23 \pm 4,86	8	13,35 \pm 4,92	8	13,04 \pm 3,04	0,512 ²
Neutrófilos ($10^9/L$)	46	6,06 \pm 3,54	8	5,96 \pm 2,79	8	5,39 \pm 2,15	0,953 ²
Plaquetas ($10^9/L$)	46	393,93 \pm 116,30	8	442,48 \pm 127,25	8	469,16 \pm 126,90	0,190 ¹
HbS (%)	13	83,17 \pm 6,18	5	84,96 \pm 8,86	2	79,95 \pm 5,59	0,487 ²
HbF (%)	25	9,93 \pm 4,78	7	12,3 \pm 10,62	5	16,62 \pm 8,02	0,235 ²

LDH – Lactato desidrogenase; VGM – Volume globular médio; HGM – Hemoglobina globular média; HbS – Hemoglobina S; HbF – Hemoglobina fetal

¹ANOVA

²Kruskal-Wallis

Significância estatística para *p-value* < 0,05

A negrito encontram-se as diferenças estatisticamente significativas entre grupos

Os genótipos Senegal/Senegal e Bantu/Bantu demonstraram ter uma associação positiva na contagem de eritrócitos, já o genótipo Benim/Benim, exibe uma ligeira diminuição dessa contagem.

A homozigotia dos haplótipos Senegal e Benim, foi associada a um aumento da hemoglobina. Quando se faz menção à HbF, o principal parâmetro de estudo de associação dos haplótipos apresentado na literatura, o genótipo Senegal/Senegal aparenta estar relacionado ao aumento da percentagem média desse parâmetro. Já o haplótipo Bantu/Bantu, é citado⁷⁵ como um dos haplótipos que demonstra estar associado a níveis mais baixos de HbF. Nesta população pediátrica os resultados obtidos foram paralelos ao descrito na literatura e este haplótipo mostrou-se desta forma como o menos benéfico relativamente à concentração de HbF. No entanto, tanto a concentração de plaquetas como a concentração de leucócitos, parâmetros que como verificado contribuem para ocorrência de crises vaso-oclusivas, encontram-se reduzidos neste grupo quando comparados com os restantes grupos. Os indicadores de hemólise, percentagem de reticulócitos, bilirrubina total e a concentração de LDH, apresentam valores médios que indicam uma menor taxa de hemólise no genótipo Bantu/Bantu. No entanto dado a baixa dimensão da amostra todas estas constatações poderão estar a sofrer um certo enviesamento.

Os doentes subdivididos nos vários grupos com diferentes haplótipos apresentaram um VGM dentro dos valores normais, verificando-se uma diferença estatisticamente significativa entre os genótipos Bantu/Bantu e Benim/Benim ($p = 0,033$). Quanto ao HGM, o genótipo Bantu/Bantu demonstrou ser um desvio à regra, apresentando uma ligeira hipocromia, ao contrário de todos os outros haplótipos que apresentaram valores dentro dos parâmetros normais, detetando-se uma diferença estatisticamente significativa entre os genótipos Bantu/Bantu e Benim/Benim ($p = 0,021$). Eventualmente estes achados podem ser consequentes à presença de mais casos de α -talassémia no grupo de doentes Bantu/Bantu.

Sendo o foco deste estudo a avaliação da influência dos haplótipos na mitigação da gravidade da anemia drepanocítica, estabeleceu-se a gravidade da anemia com base nos dados da DGS apresentados na Tabela 4.3. Segundo a DGS, valores de hemoglobina inferiores a 8,0g/dL são classificados como anemia severa, enquadrando-se nesta classificação o genótipo Bantu/Bantu. Os genótipos Benim/Benim e Senegal/Senegal apresentaram valores de hemoglobina superiores a 8,0g/dL e inferiores a 11,0g/dL assim, são categorizados como anemia moderada.

Quando comparado os valores da hemoglobina e da HbF, a baixa concentração de hemoglobina e HbF na presença do genótipo Bantu/Bantu, levam à dedução de que o

haplótipo Bantu é o que confere maior risco de gravidade relativamente à drepanocitose. Apreciações análogas são mencionadas na literatura para este genótipo^{77,124}.

Na Tabela 4.12 é exposta a associação entre a homozigotia dos haplótipos Bantu, Benim e Senegal e as variáveis clínicas. Apesar de nenhuma das variáveis apresentar significância estatística, é possível constatar que o grupo com o genótipo Bantu/Bantu apresenta frequências relativas superiores na maioria das variáveis clínicas em estudo (icterícia, litíase biliar, esplenomegalia e doença pulmonar crónica) quando comparado com os outros genótipos. Todas as variáveis clínicas citadas são consequência de repetidas lesões causadas pela obstrução dos vasos, uma vez que a percentagem de HbF é inferior no genótipo Bantu/Bantu, há mais tendência de formação de eritrócitos falciformes, o que proporciona uma maior probabilidade de obstrução. O genótipo Benim/Benim apresentou uma frequência relativa superior aos outros grupos da variável hepatomegalia. A litíase biliar foi verificada em 40,00% dos indivíduos com o genótipo Senegal/Senegal, sendo o genótipo Benim/Benim aquele com menor frequência relativa desta manifestação. Quanto às cardiopatias, o grupo com genótipo Senegal/Senegal exibiu uma menor frequência relativa para outras cardiopatias além dos sopros cardíacos e neste todas as restantes variáveis clínicas demonstraram frequências relativas inferiores aos demais grupos. Neste estudo os genótipos não mostraram influenciar as seguintes variáveis clínicas: hipertensão pulmonar, cardiopatia e sopros cardíacos.

Estes resultados mostram uma vez mais que o genótipo Senegal/Senegal aparenta ser um modificador genético que beneficia os indivíduos drepanocíticos já que as frequências relativas apresentadas das diferentes manifestações clínicas mostram uma tendência na redução dos acontecimentos. A homozigotia do haplótipo Benim mostrou também alguma capacidade protetora para os seus possuidores. Dos três genótipos estudados, o Bantu/Bantu é aquele que menos aparenta favorecer os indivíduos drepanocíticos, uma vez que apresenta frequências relativas da maioria das variáveis clínicas superiores aos restantes grupos, indicando que as complicações clínicas surgem mais precocemente.

Tabela 4.12. Associação entre o fenótipo clínico e os diferentes genótipos do agrupamento génico da β -globina

Variáveis clínicas	Bantu/Bantu			Benim/Benim			Senegal/Senegal			<i>p-value</i>
	n	Sim (%)	Não (%)	n	Sim (%)	Não (%)	n	Sim (%)	Não (%)	
Icterícia	45	35 (77,78)	10 (22,22)	8	6 (75,00)	2 (25,00)	8	5 (62,50)	3 (37,50)	0,652
Litíase biliar	32	15 (46,87)	17 (53,13)	7	2 (28,57)	5 (71,43)	5	2 (40,00)	3 (60,00)	0,668
Esplenomegalia	41	8 (19,51)	33 (80,49)	8	1 (12,50)	7 (87,50)	8	1 (12,50)	7 (87,50)	0,822
Hepatomegalia	42	13 (30,95)	29 (69,05)	8	3 (37,50)	5 (62,50)	6	0 (0,00)	6 (100,00)	0,243
Doença pulmonar crónica	46	2 (4,35)	44 (95,65)	8	0 (0,00)	8 (100,00)	8	0 (0,00)	8 (100,00)	0,698
Hipertensão pulmonar	46	0 (0,00)	46 (100,00)	8	0 (0,00)	8 (100,00)	8	0 (0,00)	8 (100,00)	-
Cardiopatia	46	46 (100,00)	0 (0,00)	8	8 (100,00)	0 (0,00)	8	8 (100,00)	0 (0,00)	-
Sopros cardíacos	46	46 (100,00)	0 (0,00)	8	8 (100,00)	0 (0,00)	8	8 (100,00)	0 (0,00)	-
Outra cardiopatia	33	23 (69,70)	10 (30,30)	7	4 (57,14)	3 (42,86)	4	4 (100,00)	0 (0,00)	0,319
Êxito fatal	46	1 (2,17)	45 (97,83)	8	0 (0,00)	8 (100,00)	8	0 (0,00)	8 (100,00)	0,838

Teste χ^2
Significância estatística para *p-value* < 0,05

A presença da variante T do polimorfismo rs7482144 C>T é exclusivo dos haplótipos Árabe-Indiano e Senegal. Nesta população de crianças de ascendência africana não foi verificado o haplótipo Árabe-Indiano. No entanto, os oito indivíduos com homozigotia para o haplótipo Senegal revelaram um aumento médio da concentração de HbF, o que poderá estar correlacionado com a presença da referida variante.

A homozigotia para o haplótipo Senegal aponta para níveis de HbF, bem como a contagem de eritrócitos e níveis de hemoglobina, sugestivos de uma vantagem protetora dos efeitos mais graves da drepanocitose. Em contraste, a homozigotia para o haplótipo Bantu aparenta desfavorecer os seus detentores, já que os níveis de hemoglobina estão enquadrados numa anemia severa e apresenta a menor concentração de HbF em comparação com os outros haplótipos.

A homozigotia para o haplótipo Senegal demonstra estar correlacionada com fatores vantajosos para a anemia drepanocítica, não só pela associação com o aumento da HbF, mas também pelo aumento dos níveis de hemoglobina bem como da contagem de eritrócitos.

4.6 Polimorfismo no gene *CYB5R3* - rs1800457 (C>G)

Para a caracterização do polimorfismo rs1800457 C>G nas nossas amostras de DNA procedeu-se à amplificação, por PCR, do exão 5 do gene *CYB5R3*, tal como descrito na secção de Materiais e métodos. O sucesso da amplificação foi confirmado pela visualização de um fragmento de 500 pb. A confirmação da amplificação foi realizada em gel de agarose após eletroforese, como pode ser verificado, para algumas amostras, na Figura 4.11.

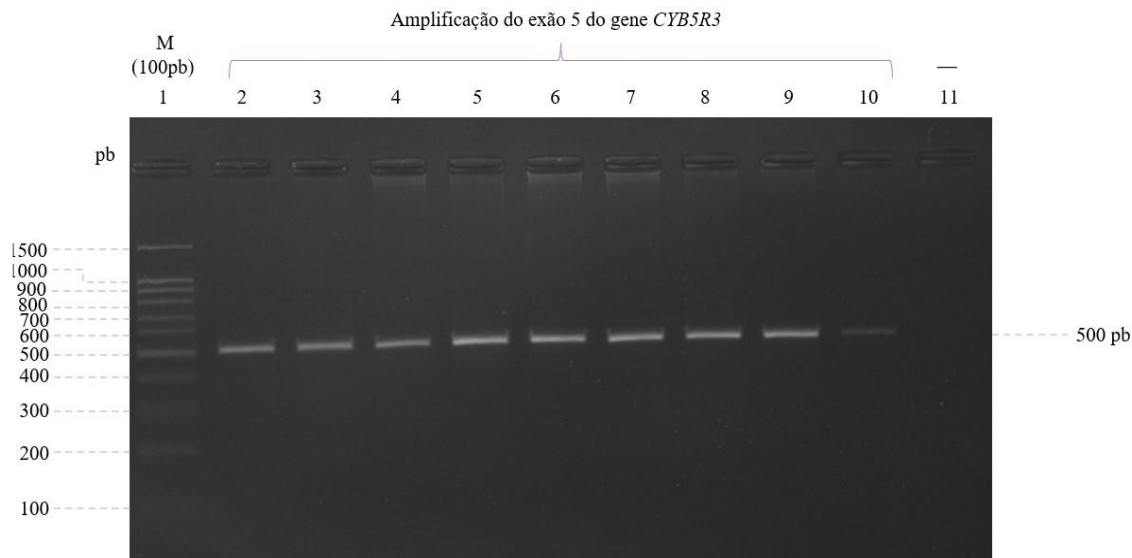


Figura 4.11. Visualização em gel de agarose dos produtos da amplificação do exão 5 do gene *CYB5R3* de algumas amostras. A revelação do gel de agarose 2% (p/v) permite a confirmação da amplificação do exão 5 do gene *CYB5R3* para posterior sequenciação de Sanger. Na primeira posição encontra-se o marcador de peso molecular de 100 bp (M); da 2ª à 10ª posição é possível visualizar o fragmento de tamanho esperado; na 11ª posição encontra-se o controle negativo do PCR (-).

Após a amplificação, as amostras foram purificadas e procedeu-se à sua sequenciação pelo método de Sanger, tal como descrito na secção de materiais e métodos. A leitura das sequências das amostras foi realizada com recurso ao software FinchTV v1.4.0 (Geospiza Inc.).

Pela sequenciação de Sanger obteve-se um dos três resultados possíveis que podem ser visualizados nos eletroferogramas apresentados na Figura 4.12. Os resultados observados variaram entre homozigotia para o alelo C, heterozigotia dos alelos C/G e homozigotia para o alelo G.

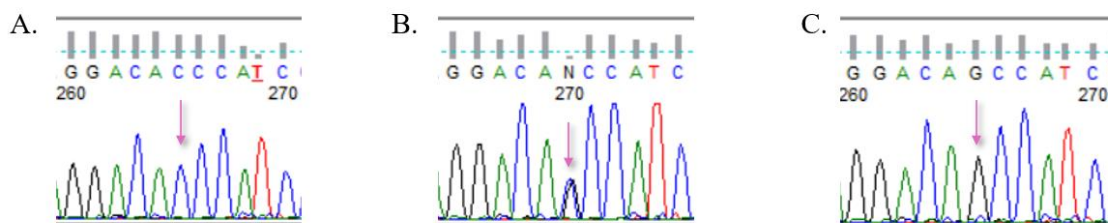


Figura 4.12. Eletroferograma dos possíveis resultados da sequenciação de Sanger para a caracterização do polimorfismo rs1800457 no exão 5 do gene *CYB5R3*. (A) A seta indica a leitura da homozigotia C/C. (B) A seta indica a sobreposição da leitura dos dois nucleótidos C e G, apontando para heterozigotia. (C) A seta indica a leitura da homozigotia G/G.

A Figura 4.13 apresenta os resultados obtidos correspondentes ao número de indivíduos em função dos diferentes genótipos. A homozigotia para o alelo C foi verificada em 31 crianças, que corresponde a 38,27% das 81 crianças em estudo. A heterozigotia para os alelos C/G foi observada em 43 crianças, o que corresponde a 53,09% da amostra. A homozigotia para o alelo G foi constatada em sete crianças, 8,64% do universo populacional do presente estudo. Observando-se a frequência alélica, constatamos que o alelo C na amostra populacional em estudo corresponde a 64,8%, sendo os restantes 35,2% contabilizados referentes ao alelo G.

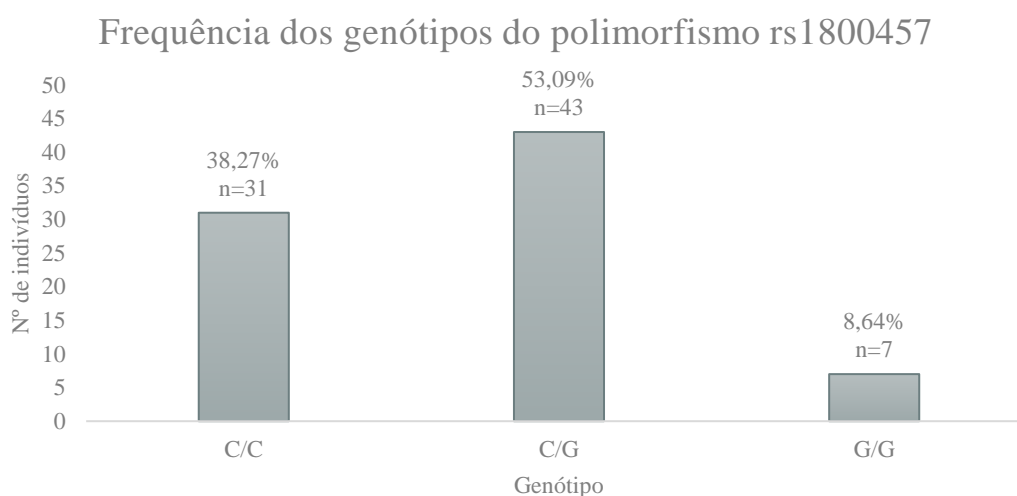


Figura 4.13. Frequência dos genótipos do polimorfismo rs1800457 no gene *CYB5R3*. Verifica-se 31 (38,27%) crianças homozigóticas para o alelo C, 43 (53,09%) crianças heterozigóticas e sete (8,64%) crianças homozigóticas para o alelo G.

Quanto à proporção dos três diferentes genótipos deste polimorfismo, a nossa população em estudo não demonstrou desvios significativos, pelo que aparenta estar em equilíbrio de HW, com 95% de significância $\chi^2_{(1, N = 81)} = 2,18; p = 0,14$.

Confrontando os nossos resultados com a frequência alélica da população africana descrita no “1000 genomes project”, que é de 66% para o alelo C e de 34% para o alelo G, verifica-se que a população em estudo segue um comportamento alélico muito semelhante. Afunilando-se a comparação com o “1000 genomes project”, dentro dos grupos populacionais africanos, averiguou-se a frequência alélica no grupo étnico-linguístico “Yoruba”, grupo este que por ser nigeriano, é o mais semelhante com o apresentado no corrente estudo. A população Yoruba apresentou 61% do alelo C e 39%

do alelo G. De realçar que as populações não africanas (por exemplo a europeia e a asiática), são nesse projeto apresentadas com zero frequência do alelo variante G, pelo que foi levantada a hipótese de ter havido/haver na população africana uma seleção positiva que tem sido benéfica para o aumento do alelo variante nesta população.

O polimorfismo rs1800457 no gene *CYB5R3* localizado no cromossoma 22, causa uma alteração do aminoácido Treonina para Serina. Apesar de ambos os aminoácidos serem polares e muito semelhantes a nível estrutural, sendo uma variante *missense* houve necessidade de se clarificar o impacto dessa variante na estrutura da proteína. Desta forma, foi realizada uma análise *in silico* através do *software PolyPhen-2*. Esta análise permite prever a gravidade da alteração de um aminoácido numa proteína atribuindo um *score* de 0,00 a 1,00, consoante o grau de patogenicidade: sendo 0,00 um baixo risco de patogenicidade e 1,00 um elevado risco de patogenicidade. Para esta alteração, o *PolyPhen-2* atribuiu um *score* de gravidade de 0,005 (Figura 4.14) prevendo a variante como uma alteração benigna. De modo a consolidar o estudo *in silico* acima descrito, recorreu-se à base de dados *ClinVar*. A informação disposta nessa base de dados avalia também a alteração como benigna sem demonstrações de conflitos relativamente à possibilidade de patogenicidade.

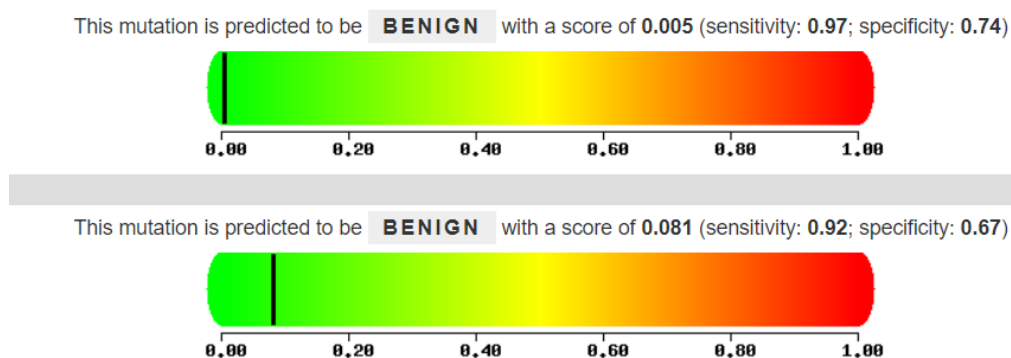


Figura 4.14. Resultado da previsão do *software PolyPhen-2* para a variante rs1800457 ao nível da proteína CYB5R3.

4.6.1 Estudos de associação do polimorfismo rs1800457 com a gravidade dos fenótipos hematológicos e bioquímicos

Analisou-se o possível papel modelador do SNP rs1800457 C>G quanto aos parâmetros hematológicos e quanto aos indicadores de hemólise dos doentes drepanocíticos. A análise foi realizada com base numa comparação seguindo o modelo

dominante, sendo a população dividida em dois grupos; detentores do genótipo CC (*wild type*) e detentores dos genótipos que contêm a variante (CG e GG). Os resultados obtidos encontram-se descritos na Tabela 4.13.

Tabela 4.13. Associação entre o fenótipo hematológico e hemolítico e o SNP rs1800457 do gene *CYB5R3*

Variáveis	CC		CG+GG		p-value
	n	Média ± DP	n	Média ± DP	
Eritrócitos (x10¹²/L)	30	3,08 ± 0,49	50	3,02 ± 0,56	0,378 ²
Hemoglobina (g/dL)	31	8,09 ± 1,03	50	7,90 ± 0,82	0,469 ²
Reticulócitos (%)	30	12,46 ± 5,34	49	12,30 ± 5,60	0,848 ²
Hematócrito (%)	30	24,03 ± 2,74	50	23,53 ± 2,45	0,404 ¹
Leucócitos (10⁹/L)	30	12,86 ± 3,80	50	12,77 ± 4,67	0,626 ²
Neutrófilos (10⁹/L)	30	5,90 ± 3,05	50	6,14 ± 3,07	0,858 ²
Plaquetas (10⁹/L)	30	415,26 ± 108,00	50	421,43 ± 126,14	0,824 ¹
LDH (U/L)	11	729,37 ± 273,89	15	742,87 ± 200,26	0,886 ¹
Bilirrubina total (mg/dL)	29	2,84 ± 1,63	45	3,12 ± 1,57	0,409 ²
HbS (%)	8	82,14 ± 8,22	17	81,87 ± 7,00	0,932 ¹
HbF (%)	17	12,49 ± 7,92	29	11,35 ± 6,63	0,641 ²

LDH – Lactato desidrogenase; **HbS** – Hemoglobina S; **HbF** – Hemoglobina fetal

¹Teste-t

²Mann-Whitney

Significância estatística para *p-value* < 0,05

Os dois grupos, sem e com a variante, apresentam valores relativamente semelhantes quando analisada a contagem de eritrócitos e a concentração de hemoglobina.

O leucograma demonstrou que a contagem de neutrófilos em ambos os grupos encontra-se dentro dos valores normais tabelados pela DGS, e não há diferença significativa entre eles. Da contagem de leucócitos constata-se que os dois grupos têm uma contagem acima dos valores normais, e a ligeira diferença entre eles não é significativa. O grupo *wild type* demonstra uma contagem plaquetária ligeiramente inferior à do grupo que possui o alelo G.

Os parâmetros hemolíticos como LDH e bilirrubina total do grupo *wild type* exibem uma concentração ligeiramente inferior em comparação com os detentores do alelo G. Pelo contrário, relativamente à contagem de reticulócitos, esta contagem foi ligeiramente superior no grupo *wild type*.

O grupo homozigótico para o alelo C (*wild type*) revelou um aumento de 1,14% no nível de HbF em comparação com grupo de crianças homozigóticas ou heterozigóticas para o alelo G e um aumento de 0,27% de HbS.

Em conclusão, com base no valor médio de hemoglobina, as crianças do grupo *wild type* (CC) manifestam anemia moderada, já o valor médio do grupo das crianças homozigóticas ou heterozigóticas para o alelo G indica que estas apresentam anemia severa. Os dados bioquímicos, nomeadamente referentes à LDH e à bilirrubina total, parecem indicar também que no grupo *wild type* a taxa de hemólise é inferior à do grupo detentor do alelo G, o que poderá estar relacionado com o facto da percentagem de HbF ser superior no grupo *wild type*, prevenindo a lise dos eritrócitos.

Perante a alteração rs1800457 C>G, os resultados observados não suportam a hipótese de que haja uma associação benéfica em relação à anemia drepanocítica e não corroboram os resultados obtidos no estudo efetuado por Gordeuk, V. R. *et al.*⁷⁸. Estes autores sugerem que a proteção da alteração esteja relacionada com a anemia grave onde existe um aumento do stresse oxidativo. Os autores definiram anemia grave quando a hemoglobina é inferior a 5 g/dL ou o hematócrito inferior a 15%. Para a análise da suposição desta alteração dentro da perspectiva dos autores, selecionou-se um grupo de crianças com hemoglobina < 8 g/dL, uma vez que dentro desta população nenhuma das crianças apresenta hemoglobina inferior a 5g/dL e, segundo a OMS o patamar para que se considere anemia grave, são valores de hemoglobina < 8 g/dL. No total das 81 crianças da população, 43 registaram hemoglobina < 8 g/dL, sendo 16 crianças com o genótipo CC, três com o genótipo GG e 24 com o genótipo CG. Voltou-se a realizar o estudo de associação genótipo / fenótipo hematológico e bioquímico, mas apenas para as referidas 43 crianças com anemia severa (Tabela 4.14).

Tabela 4.14. Associação entre o fenótipo hematológico e hemolítico das crianças com anemia severa e o SNP rs1800457 do gene *CYB5R3*

Variáveis	CC		CG+GG		P-value
	n	Média ± DP	n	Média ± DP	
Eritrócitos (x10 ¹² /L)	16	2,94 ± 0,49	27	2,75 ± 0,35	0,198 ²
Hemoglobina (g/dL)	16	7,36 ± 0,49	27	7,30 ± 0,39	0,536 ²
Reticulócitos (%)	16	13,61 ± 5,23	27	13,88 ± 5,42	0,877 ¹
Hematócrito (%)	16	21,98 ± 1,73	27	21,93 ± 1,68	0,927 ¹
LDH (U/L)	4	522,25 ± 56,59	8	865,50 ± 102,06	0,007¹
Bilirrubina total (mg/dL)	16	2,56 ± 1,10	25	3,08 ± 1,49	0,235 ²
HbS (%)	5	86,46 ± 5,06	8	82,53 ± 7,06	0,380 ¹
HbF (%)	10	9,14 ± 4,11	19	10,17 ± 5,03	0,713 ¹

LDH – Lactato desidrogenase; HbS – Hemoglobina S; HbF – Hemoglobina fetal

¹Teste-t

²Mann-Whitney

Significância estatística para *p-value* < 0,05

Os valores médios dos parâmetros hematológicos, contagem de eritrócitos, concentração de hemoglobina e hematócrito do grupo *wild type* são ligeiramente superiores aos valores médios dos mesmos parâmetros no grupo com o alelo G. Fazendo-se referência aos indicadores de hemólise (percentagem de reticulócitos, concentração de LDH e bilirrubina total), o grupo *wild type* revelou uma menor taxa de hemólise em comparação com o grupo com o alelo G. Neste âmbito, foi detetada uma diferença estatisticamente significativa no que se refere à LDH ($p = 0,007$).

O grupo *wild type* apresentou, no entanto, uma percentagem média de HbF inferior à percentagem do grupo com o alelo G; como consequência, verifica-se um aumento de HbS no grupo *wild type* em comparação com o grupo do alelo G. Em conclusão, este tipo de análise continua a mostrar-nos que a variante em causa não tem um efeito benéfico sobre as manifestações hematológicas e bioquímicas da drepanocitose. Pelo contrário, a presença da referida variante genética encontra-se associada a uma maior taxa de hemólise.

Assim como a prevalência da malária possivelmente instigou a perpetuação da mutação drepanocítica através de uma pressão seletiva, a prevalência da alteração *CYB5R3*^{c.350C>G} em zonas de alta prevalência da drepanocitose e simultaneamente zonas endémicas de malária, levou a que tenha sido levantada a hipótese de que a alteração pudesse estar associada a um fator benéfico da drepanocitose. Contudo os nossos resultados não validaram esta hipótese. Pelo contrário, quando confrontando os achados hematológicos e bioquímicos do grupo de crianças *wild type*, com o grupo de crianças

que apresentam a alteração em homozigotia ou em heterozigotia, este último grupo apresenta desvantagens fisiológicas como anemia severa e aumento da taxa de hemólise.

O gene *CYB5R3* codifica para a enzima que é responsável pela conversão da MetHb em hemoglobina e, ainda que a alteração c.350C>G não tenha um significado funcional relatado até ao momento, a alteração *missense* poderá diminuir a atividade da enzima *CYB5R3*. Observou-se na análise *in silico* que a alteração indica ser benigna, contudo, apesar do baixo risco de patogenicidade com um *score* atribuído de 0,005, poderá este valor revelar essa ligeira diminuição da atividade.

Ainda assim, a fim de uma avaliação mais crítica, considerou-se que perante condições de anemia extrema, a alteração poderia manifestar-se positivamente. Esta observação conduziu à análise dos parâmetros hematológico e dos fatores hemolíticos nas crianças do estudo que apresentam valores de hemoglobina correspondentes a anemia severa. Desta análise foi verificado que os parâmetros hematológicos pouco diferenciaram entre o grupo possuidor do alelo C em homozigotia e do grupo detentor do alelo G em homozigotia ou heterozigotia. Contudo, verifica-se uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos quando se trata dos parâmetros hemolíticos, nomeadamente no nível de LDH. Esta última observação poderá transparecer a ocorrência de uma elevada lise eritrocitária no grupo detentor do alelo G em homozigotia ou heterozigotia, grupo este onde se verifica os indicadores hemolíticos elevados. No mesmo grupo, verificou-se ainda uma percentagem de HbF superior à do grupo contraposto. Apesar da HbF circunstancialmente ser um modificador genético que proporciona o efeito antifalciformizante, foi descrito anteriormente que a sua interpretação deve ser considerada com prudência, uma vez que devido à elevada taxa de hemólise o stress eritropoiético estimula a síntese de HbF o que poderá justificar a elevação da HbF neste grupo.

Contrariamente aos resultados obtidos no presente estudo, Gordeuk, V. R. *et al.*⁷⁸ associaram o polimorfismo *CYB5R3*^{c.350C > G} à redução da hemólise em pacientes com doença falciforme e em pacientes com malária, onde foi verificado também aumentos progressivos da concentração da hemoglobina nos heterozigóticos e nos homozigóticos. No referido artigo, o estudo da alteração foi realizado em análise simultânea com a deficiência em glucose-6-fosfato desidrogenase (G6PD), por meio da análise de dois grupos, *wild type* + heterozigóticos vs. homozigóticos para a alteração G6PD. A interferência da heterozigotia da deficiência G6PD poderá induzir a discrepância entre os

resultados dos autores e os obtidos no presente estudo. Para além disso, no mesmo artigo foi observada uma redução da atividade da enzima CYB5R3 em função da quantidade de alelos G existentes, indicando uma maior atividade desta enzima no grupo *wild type*.

É ainda importante realçar que alguns estudos realizados por *knockdown* da proteína CYB5R3 em modelos de ratinhos com doença falciforme mostraram que a diminuição da sua função enzimática pode vir a acelerar o aparecimento de doenças cardiopulmonares graves, como é o caso da hipertensão pulmonar¹²⁵. Segundo Durgin et al.¹²⁶, a variante rs1800457 do *CYB5R3* diminuiu a sua função devido a substituição de um aminoácido, pelo que, sugerem que o polimorfismo *CYB5R3*^{c.350C>G} possa servir de biomarcador para identificar doentes drepanocíticos com predisposição para doença cardiopulmonar mais grave^{125,126}.

Tal como nos estudos anteriores, neste estudo as variáveis clínicas foram também alvo de estudo (Tabela 4.15).

Tabela 4.15. Associação entre o fenótipo clínico e o polimorfismo rs1800457 C>G

Variáveis clínicas	CC			CG+GG			p-value
	n	Sim (%)	Não (%)	n	Sim (%)	Não (%)	
Icterícia	29	22 (75,86)	7 (24,14)	50	38 (76,00)	12 (24,00)	0,989
Litíase biliar	24	10 (41,67)	14 (58,33)	35	16 (45,71)	19 (54,29)	0,758
Esplenomegalia	29	5 (17,24)	24 (82,76)	46	6 (13,04)	40 (86,96)	0,617
Hepatomegalia	28	6 (21,43)	22 (78,57)	46	18 (39,13)	28 (60,87)	0,115
Doença pulmonar crónica	30	1 (3,33)	29 (96,67)	50	1 (2,00)	49 (98,00)	0,712
Hipertensão pulmonar	29	0 (0,00)	29 (100,00)	50	0 (0,00)	50 (100,00)	-
Cardiopatía	31	31 (100,00)	0 (0,00)	50	50 (100,00)	0 (0,00)	-
Sopros cardíacos	31	31 (100,00)	0 (0,00)	50	50 (100,00)	0 (0,00)	-
Outra cardiopatía	21	13 (61,90)	8 (38,10)	38	29 (76,32)	9 (23,68)	0,242
Êxito fatal	31	0 (0,00)	31 (100,00)	50	1 (2,00)	49 (98,00)	0,428

Teste χ^2
Significância estatística para *p-value* < 0,05

Através dos resultados apresentados na Tabela 4.15 é possível verificar uma tendência de comorbilidades associadas à drepanocitose, como é o caso da icterícia, litíase

biliar, hepatomegalia e outras cardiopatias, superior no grupo detentor do alelo G que no grupo *wild type*. Estes resultados uma vez mais poderão indicar um efeito prejudicial daquela alteração.

Ainda assim não se descarta a hipótese de que essa alteração possa ser benéfica na anemia malárica, uma vez que a sua prevalência coincide com as zonas onde também a malária é prevalente. Um outro fator a ser considerado é a capacidade amostra populacional em análise não representar a realidade do comportamento da alteração em consequência de um baixo número da amostra.

Em conclusão, a oposição entre os resultados que obtivemos e o reportado na literatura suscita a dúvida do efeito benéfico, no âmbito da drepanocitose, da co-herança do alelo G na posição c.350 no gene *CYB5R3*. Contudo há que referir que tanto quanto sabemos, há um único artigo publicado que efetuou estudos populacionais de averiguação sobre a relação entre este polimorfismo e as manifestações da drepanocitose, ou seja o estudo de Gordeuk, V. R. *et al.*⁷⁸. Este facto salienta a necessidade de mais estudos serem realizados neste âmbito. Sendo esta uma variante com uma alta frequência alélica na população africana, população esta com grande prevalência de drepanocitose e de malária, é de extrema importância que se venha a compreender o significado desta alteração.

4.7 Influência da hemoglobina fetal na gravidade da drepanocitose

Nos estudos que envolveram a HbF foram excluídas todas as crianças que beneficiam da terapêutica HU de modo a não interferir com os resultados da análise, sendo assim, neste tópico serão apresentadas 46 crianças.

Estipulou-se um patamar mínimo de 10% de HbF para o qual, segundo Nicolau *et al.*¹²⁷ a percentagem de HbF começa a dar indícios de eficácia para a diminuição da gravidade da anemia drepanocítica. Assim, para a realização do estudo, foram elaborados 2 grupos: HbF \geq 10% (HbF _{\geq 10}) e HbF < 10% (HbF_{<10}).

Como previamente citado, a HbF proporciona um efeito antifalciformizante, restando a polimerização da HbS desoxigenada. Por meio desse mecanismo, outros acontecimentos interligados podem favorecer os pacientes com drepanocitose e com níveis elevados de HbF. Nesse âmbito, foram confrontados as médias dos parâmetros

hematológicos e hemolíticos das crianças drepanocíticas com HbF_{<10} versus aquelas com HbF_{≥10}. Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 4.16.

Tabela 4.16. Associação entre o fenótipo hematológico e hemolítico e os níveis de HbF

Variáveis	HbF _{<10}		HbF _{≥10}		p-value
	n	Média ± DP	n	Média ± DP	
Eritrócitos (x10 ¹² /L)	22	3,01 ± 0,44	24	3,19 ± 0,62	0,300 ²
Hemoglobina (g/dL)	22	7,76 ± 0,75	24	8,23 ± 0,91	0,068 ²
Reticulócitos (%)	22	12,35 ± 4,63	24	9,96 ± 5,09	0,017 ²
LDH (U/L)	18	808,92 ± 162,86	7	688,79 ± 160,25	0,125 ¹
Bilirrubina total (mg/dL)	20	2,74 ± 1,33	21	2,63 ± 1,55	0,531 ²
Hematócrito (%)	22	23,30 ± 1,88	24	24,32 ± 2,41	0,118 ¹
Leucócitos (10 ⁹ /L)	22	14,02 ± 4,27	24	12,44 ± 3,80	0,191 ¹
Neutrófilos (10 ⁹ /L)	22	6,00 ± 3,00	24	6,01 ± 3,57	0,996 ²
Plaquetas (10 ⁹ /L)	22	449,90 ± 105,17	24	393,20 ± 111,16	0,083 ¹
HbF (%)	22	6,39 ± 2,04	24	16,70 ± 6,40	<0,001 ²
HbS (%)	11	86,06 ± 6,48	14	78,73 ± 6,24	0,006 ¹

LDH – Lactato desidrogenase; HbS – Hemoglobina S; HbF – Hemoglobina fetal

¹Teste-t

²Mann-Whitney

Significância estatística para p-value < 0,05

Na população em estudo, o grupo de crianças com a HbF_{≥10} demonstrou um ligeiro aumento da quantidade de eritrócitos e conseqüentemente elevou os valores do hematócrito. No mesmo grupo, verificou-se também que os níveis de hemoglobina sofrem um aumento quando comparado com os níveis do grupo HbF_{<10}.

A fim de se avaliar mais detalhadamente a influencia da HbF na anemia hemolítica associada à drepanocitose, analisou-se as possíveis diferenças nos indicadores bioquímicos da taxa de hemólise entre os dois grupos: o grupo com HbF_{≥10} manifestou níveis de LDH e contagem de reticulócitos inferiores, indicando uma menor taxa de hemólise. A contagem de reticulócitos é um dos parâmetros de hemólise que apresenta uma diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos (p = 0,017). Os valores de hemoglobina indicam que o grupo com HbF_{<10} apresenta anemia severa, ao contrário do grupo com HbF_{≥10} que apresentam anemia moderada. Assim, podemos concluir que a HbF elevada (≥10%) encontra-se associada a uma melhoria na anemia e no grau de hemólise nestas crianças drepanocíticas.

A contagem dos leucócitos, neutrófilos e plaquetas em indivíduos com drepanocitose foi também analisada e confrontada com o nível de HbF, uma vez que é

sabido que estes fatores podem influenciar o desenvolvimento da vaso-oclusão e a gravidade da drepanocitose. A contagem de neutrófilos, em ambos os grupos mencionados, encontra-se dentro dos valores de referência, segundo os dados fornecidos pela DGS¹⁰². Quando analisada a contagem de leucócitos, verificamos que o valor é superior aos valores de referência em ambos os grupos, mas ainda assim, podemos constatar que o grupo com $HbF_{\geq 10}$ apresenta valores mais reduzidos quanto a este parâmetro. O grupo com $HbF_{< 10}$ demonstra uma contagem de plaquetas acima dos valores de referência, ao contrário do grupo com $HbF_{\geq 10}$. Assim, ao ser observada uma melhoria na generalidade destes parâmetros nas crianças do grupo $HbF_{\geq 10}$ podemos levantar a hipótese de que este grupo registre uma menor quantidade de crises vaso-oclusivas. Este parâmetro clínico não foi, no entanto, avaliado.

No panorama geral, o nível de $HbF_{\geq 10}$ poderá indiciar um fenótipo hematológico e bioquímico mais moderado para esses pacientes. A polimerização da HbS tem como consequência a alteração da estrutura dos eritrócitos para a forma de foice, alongando-os, e tornando-os rígidos e sem flexibilidade. Esta particularidade estimula a destruição destas células do sangue. Por a HbF ser uma proteína que não participa na polimerização, uma elevada quantidade intracelular traduz-se numa maior flexibilidade dos eritrócitos falciformes. A análise no grupo de crianças com $HbF_{\geq 10}$ demonstra uma diminuição dos parâmetros hemolíticos que aparenta estar relacionada com a condição da HPFH. Além disso, a diminuição da hemólise pode também manifestar-se com o aumento da contagem de eritrócitos, uma vez que a destruição desses fica reduzida.

A leucocitose é verificada em ambos os grupos, devido ao ambiente pró-inflamatório causado pelas próprias características da drepanocitose. O grupo da $HbF_{\geq 10}$ demonstra uma contagem mais reduzida de leucócitos o que, possivelmente, estará relacionado com o menor número de episódios de crises vaso-oclusivas, e provavelmente estas de intensidade mais ligeira, devido à maior flexibilidade dos eritrócitos, como reportado no parágrafo anterior. Consequentemente, a intensidade dos processos inflamatórios diminui e por sua vez, há um decréscimo da contagem de leucócitos.

Na drepanocitose, devido à elevada lise celular, a biodisponibilidade do NO encontra-se reduzida, favorecendo a diminuição do número de plaquetas e a trombocitose. Neste estudo, foi verificado que as crianças pertencentes ao grupo da $HbF_{< 10}$ têm um aumento da contagem de plaquetas. Esse mesmo grupo exhibe também uma taxa de

hemólise superior, o que poderá indicar que o processo de biodisponibilidade de NO seja em parte responsável por esse aumento plaquetário.

O efeito da HbF foi também analisado quanto às complicações clínicas da doença. Os resultados encontram-se apresentados na Tabela 4.17.

Tabela 4.17. Associação entre o fenótipo clínico e os níveis de HbF

Variáveis clínicas	HbF _{<10}			HbF _{≥10}			p-value
	n	Sim (%)	Não (%)	n	Sim (%)	Não (%)	
Icterícia	22	14 (63,64)	8 (36,36)	23	15 (65,22)	8 (34,78)	0,912
Litíase biliar	17	7 (41,18)	10 (58,82)	13	6 (46,15)	7 (53,85)	0,785
Esplenomegalia	22	3 (13,64)	19 (86,36)	21	5 (23,81)	16 (76,19)	0,391
Hepatomegalia	21	5 (23,81)	16 (76,19)	21	4 (19,05)	17 (80,95)	0,707
Doença pulmonar crônica	22	0 (0,00)	22 (100,00)	23	0 (0,00)	23 (100,00)	-
Hipertensão pulmonar	22	0 (0,00)	22 (100,00)	23	0 (0,00)	23 (100,00)	-
Cardiopatia	22	22 (100,00)	0 (0,00)	24	24 (100,00)	0 (0,00)	-
Sopros cardíacos	22	22 (100,00)	0 (0,00)	24	24 (100,00)	0 (0,00)	-
Outra cardiopatia	19	11 (57,89)	8 (42,11)	14	10 (71,43)	4 (28,57)	0,424
Êxito fatal	22	0 (0,00)	22 (100,00)	24	0 (0,00)	24 (100,00)	-

Teste χ^2
Significância estatística para *p-value* < 0,05

No grupo HbF_{<10} a icterícia foi verificada em 63,60% das crianças enquanto que este sintoma foi verificado em 65,22% das crianças pertencentes ao grupo HbF_{≥10}. A ocorrência de litíase biliar foi reportada em 41,18% das crianças do grupo HbF_{<10} e em 46,15% do grupo HbF_{≥10}. O grupo HbF_{<10} apresentou menor quantidade de indivíduos com esplenomegalia em comparação com o grupo HbF_{≥10}, respectivamente, 13,60% e 23,81%. Já os casos de hepatomegalia foram observados em 23,81% das crianças pertencentes ao grupo HbF_{<10} e em 19,05% das crianças com HbF_{≥10}. Os casos de outras cardiopatias que não sopros cardíacos, manifestou-se em 57,89% das crianças integrantes do grupo HbF_{<10} e em 71,43% das crianças com HbF_{≥10}.

Apesar do grupo HbF_{≥10} demonstrar valores hematológicos e bioquímicos sugestivos de um progresso benéfico das complicações associadas à drepanocitose, no

presente estudo de evolução clínica não se verificou uma associação a esse nível. De facto, níveis elevados de HbF não é sinónimo de ausência de manifestações clínicas da drepanocitose e, apesar de amenizar o curso hematológico, fatores como anemia, destruição prematura de eritrócitos e falciformização continuam presentes nessa patologia levando aos danos nos diversos órgãos. Além disso, poderá existir uma relação entre heterogeneidade da HbF de eritrócito para eritrócito, pelo que ainda que a concentração total de HbF seja elevada, a percentagem de HbF pode variar de célula para célula sendo que os eritrócitos com menor concentração de HbF têm maior similaridade com os eritrócitos falciformes podendo contribuir de igual forma para os danos nos órgãos. É também importante realçar que o processo de indução de HbF pode ser instigado pela própria gravidade da drepanocitose.

É de notar que a HU é uma das terapêuticas utilizadas para elevar os valores da HbF. Ainda que não esteja dentro do âmbito deste trabalho, observar a ação da terapêutica pode permitir retirar conclusões acerca dos efeitos da HbF e no capítulo Introdução foi referido que a HU não é solução para erradicar a drepanocitose e os danos que acarreta, sustentando-se os resultados obtidos no presente estudo. Contudo, tendo sido a HU aprovada apenas em 1998 para adultos e sendo a drepanocitose uma doença progressiva que na idade adulta já manifesta deteriorações em vários órgãos, a compreensão relativamente à ação da HbF induzida pela HU poderá ser prematura. Uma melhor compreensão pode surgir por meio da recente aprovação desta terapêutica em crianças.

5 Conclusões e perspectivas futuras

A drepanocitose é uma hemoglobinopatia causada por uma mutação *missense* que consequentemente altera a estrutura da β -globina, constituinte da hemoglobina, dando origem à HbS. Embora seja uma doença monogénica apresenta-se como uma doença multissistémica, de elevada morbidade e mortalidade, sobretudo no continente Africano, de onde é originária. A drepanocitose é fenotipicamente heterogénea, e neste sentido, conhecer os modeladores genéticos que alteram a progressão da doença ajudará a compreender a sua fisiopatologia. Estes conhecimentos poderão eventualmente ser usados para adaptar a terapêutica de forma personalizada, aumentando a esperança média de vida e oferecendo uma melhor qualidade de vida a estes doentes.

O presente estudo teve como finalidade avaliar regiões polimórficas nos genes *HBA*, *HBG2* e *CYB5R3*, assim como regiões polimórficas no agrupamento génico da β -globina, e investigar os seus efeitos na alteração dos fenótipos hematológico, bioquímico e clínico em crianças com drepanocitose. Avaliou-se, ainda, a influência do nível de HbF na modulação dos mesmos fenótipos nesta patologia.

Para este fim, caracterizou-se genotipicamente 81 crianças diagnosticadas com drepanocitose e com idades compreendidas entre os 3 e os 17 anos, que foram avaliadas do ponto de vista clínico, hematológico e bioquímico em consultas da especialidade em hospitais na região de Lisboa.

A caracterização demográfica desta população mostrou que a grande maioria das crianças em estudo são filhos de imigrantes de origem africana. Maioritariamente têm ascendência angolana, mostrando que a migração tem dispersado a patologia para além da sua área geográfica de origem (continente africano).

Através da genotipagem dos genes *HBA* verificou-se uma elevada frequência da deleção $-\alpha^{3,7}\text{kb}$, causadora de α -talassémia. Das 81 crianças em estudo, 30 (37,04%) apresentaram a referida deleção em heterozigotia e cinco (6,17%) em homozigotia. Esta elevada prevalência de α -talassémia é explicada pela ascendência africana que estas crianças têm.

Os estudos de associação genótipo/fenótipos referentes à deleção $-\alpha^{3,7}\text{kb}$ demonstraram que as crianças que são detetoras da deleção em homozigotia ou em heterozigotia manifestam alterações vantajosas a nível hematológico e bioquímico, uma

vez que se verificou um aumento da contagem de eritrócitos e uma redução da taxa hemolítica, com conseqüente diminuição da gravidade da anemia. Ainda assim, a coherança não demonstrou ser impeditiva do surgimento das complicações clínicas.

Foi caracterizado o polimorfismo rs7482144 (C>T) localizado no promotor do gene *HBG2*. O alelo T apresentou uma frequência de 15% na população em estudo. Os estudos de associação genótipo/fenótipos realizados para este SNP mostraram que o grupo de indivíduos que possuem o alelo variante T beneficiam de níveis de HbF mais elevados quando confrontado com o grupo *wild type* para este SNP. Verificou-se também uma diminuição dos parâmetros hemolíticos bem como da concentração de HbS no grupo com o genótipo T, indicando deste modo uma redução da lise celular. Conseqüentemente, foi observada redução da anemia comprovado pelo aumento da concentração da hemoglobina. A presença do alelo T aparenta ainda estar associada a uma menor frequência relativa das complicações clínicas, com exceção das cardiopatias.

No estudo dos haplótipos do agrupamento génico da β -globina, foram identificados quatro tipos de haplótipos: Bantu, Benim, Senegal e Atípico. Em termos genotípicos, os haplótipos foram observados em oito combinações distintas. Destas, 56,79% da amostra apresentaram o genótipo Bantu/Bantu, 9,88% Senegal/Senegal e 9,88% Benim/Benim. O haplótipo Bantu foi maioritariamente detetado nas crianças com origem angolana ou em crianças cujos progenitores têm essa origem geográfica.

Os estudos de associação dos haplótipos com a gravidade da drepanocitose sugerem que a presença do genótipo Bantu/Bantu desfavorece os seus detentores, uma vez que estes apresentam uma baixa concentração de HbF e uma concentração de hemoglobina inferior a 8,0 g/dL, classificando assim estes indivíduos como tendo anemia severa. No entanto, parâmetros como a concentração de plaquetas e a concentração de leucócitos em indivíduos com o genótipo Bantu/Bantu, apresentaram tendencialmente uma redução quando comparados com os demais grupos, sendo esta situação teoricamente vantajosa pela eventual diminuição das crises vaso-oclusivas.

O genótipo Senegal/Senegal mostrou estar associado a níveis mais elevados de HbF. O facto deste haplótipo ser caracterizado por conter o polimorfismo rs7482144 alelo T, sugere que pode esta alteração estar na base do aumento da HbF. Observou-se que a média da concentração de hemoglobina das crianças detetoras do genótipo Senegal/Senegal é de $8,25 \pm 1,28$ g/dL, sendo o valor mínimo de 8,0 g/dL, caracterizando-se assim como

anemia moderada. Além disso, o genótipo Senegal/Senegal apresentou uma tendência de redução de complicações clínicas, ao contrário do genótipo Bantu/Bantu que mostrou uma maior propensão ao aumento das complicações clínicas. Desta forma, poderá concluir-se que os haplótipos são influenciadores genéticos da gravidade da anemia drepanocítica.

No que se refere ao estudo do gene *CYB5R3*, avaliou-se a presença da alteração rs1800457, c.350C>G. O alelo C apresentou uma frequência de 65% e o alelo G correspondeu a 35%. O valor destas frequências alélicas foi confrontado com o descrito para a população africana analisada no “*1000 genomes project*”, tendo sido consideradas semelhantes. É de salientar que esta variante genética aparenta ser exclusiva da população africana, pelo que tem sido levantada a hipótese desse facto se dever a uma seleção positiva, ocorrida em África, provavelmente perante a malária ou a drepanocitose. Neste âmbito, um dos nossos objetivos foi avaliar a possível modulação desta variante genética nos fenótipos destas crianças drepanocíticas.

O estudo de associação genótipo/fenótipos efetuado para esta variante indicou que a presença do alelo G aparenta ser nefasta, agravando a anemia drepanocítica, uma vez que os indivíduos que a possuem apresentam uma concentração média de hemoglobina que indica anemia severa e um maior nível de hemólise. Clinicamente, foi verificado uma maior tendência de patologias no grupo detentor do alelo G que no grupo *wild type*.

Tanto quanto sabemos esta variante genética rs1800457 C>G foi reportada num único estudo, publicado recentemente, onde foi associada a um efeito protetor contra as anemias severas, malárica e drepanocítica. No entanto, no presente estudo esses resultados não foram validados. Sendo esta variante *CYB5R3* c.350C>G aparentemente exclusiva de pessoas de ascendência africana, é de todo o interesse investigar se a sua elevada prevalência em África terá sido devida a seleção positiva perante a drepanocitose e/ou a malária. Assim, como perspetivas futuras, propomos a realização de mais estudos neste âmbito de modo a esclarecer este assunto e determinar se esta variante tem, ou não, interesse clínico perante a drepanocitose.

O estudo de associação entre o nível de HbF e os diversos parâmetros hematológicos, bioquímicos e clínicos manifestados pelas crianças com drepanocitose permitiu evidenciar os seus efeitos modeladores na drepanocitose. No estudo que se efetuou verificou-se que indivíduos com HbF elevada, estipulada como igual ou superior a 10%,

apresentam parâmetros hemolíticos sugestivos de terem menor taxa de hemólise quando comparados com os indivíduos com HbF inferior a 10%. Simultaneamente, a HbF elevada foi também associada a anemia moderada, ao contrário do grupo com HbF inferior a 10% que apresenta anemia severa.

Ainda no estudo da HbF constatou-se que apesar dos efeitos benéficos que o aumento da percentagem de HbF mostrou trazer no âmbito dos fenótipos hematológicos e bioquímicos, nomeadamente ao nível da gravidade da anemia drepanocítica, e na sua taxa de hemólise, as complicações clínicas ligadas ao decurso da drepanocitose continuam presentes. Neste estudo, provavelmente pelo baixo número da amostra, não nos foi possível observar alterações benéficas a nível clínico devido aos elevados níveis de HbF. No entanto, a nível científico isso é constatado e está na base do tratamento farmacológico dos doentes drepanocíticos com HU. Eventualmente a progressão deste nosso estudo usando uma amostragem maior poderia vir a mostrar quais as manifestações clínicas que beneficiam pela presença de uma HbF elevada em crianças com drepanocitose.

Em suma, a gravidade da drepanocitose pode ser alterada através de diversos fatores genéticos e ambientais. O nosso estudo contribuiu para o conhecimento do papel modificador de alguns fatores genéticos sobre a gravidade dos fenótipos, sobretudo hematológicos e bioquímicos, das crianças com drepanocitose que vivem em Portugal.

6 Referências

1. Rogers, K. *Blood: Physiology and Circulation (The Human Body)*. (Britannica Educational Publishing, New York, 2011).
2. Kosmachevskaya, O. v. & Topunov, A. F. Alternate and additional functions of erythrocyte hemoglobin. *Biochemistry (Moscow)* **83**, 1575–1593 (2018).
3. Provan, D. & Gribben, J. *Molecular Hematology*. (John Wiley & Sons, Hoboken, 2020).
4. Bain, B. J. *Haemoglobinopathy Diagnosis*. (Blackwell Publishing Ltd, 2006).
5. Schechter, A. N. Hemoglobin research and the origins of molecular medicine. *Blood* **112**, 3927–3938 (2008).
6. Diepstraten, S. T. & Hart, A. H. Modelling human haemoglobin switching. *Blood Reviews* **33**, 11–23 (2019).
7. Higgs, D. R. *et al.* Understanding α -globin gene regulation: aiming to improve the management of thalassemia. *Annals of New York Academy of Sciences* **1054**, 92–102 (2005).
8. Sankaran, V. G. & Weiss, M. J. Anemia: progress in molecular mechanisms and therapies. *Nature medicine* **21**, 221–230 (2015).
9. Jaing, T.-H. *et al.* Molecular genetics of β -thalassemia. *Medicine* **100**, e27522 (2021).
10. Stamatoyannopoulos, J. A. Future prospects for treatment of hemoglobinopathies. *Western Journal of Medicine* **157**, 631–636 (1992).
11. Lee, J. S., Cho, S. I., Park, S. S. & Seong, M. W. Molecular basis and diagnosis of thalassemia. *Blood Research* **56**, 39–43 (2021).
12. Zittersteijn, H. A. *et al.* A small key for a heavy door: genetic therapies for the treatment of hemoglobinopathies. *Front Genome Ed* **2**, (2021).
13. Reading, N. S. *et al.* Loss of major DNase I hypersensitive sites in duplicated β -globin gene cluster incompletely silences *HBB* gene expression. *Human Mutation* **37**, 1153–1156 (2016).

14. Kohne, E. Hemoglobinopathies: clinical manifestations, diagnosis, and treatment. *Deutsches Ärzteblatt* **108**, 532–540 (2011).
15. Costa, S. N., Madeira, S., Sobral, M. A. & Delgadinho, G. Hemoglobinopatias em Portugal e a intervenção do médico de família. *Revista Portuguesa de Clínica Geral* **32**, 416–424 (2016).
16. The Lancet Global Health. Homing in on haemoglobinopathies. *The Lancet Global Health* **10**, e1 (2022).
17. Mamas, T., Kakourou, G., Vrettou, C. & Traeger-Synodinos, J. Hemoglobinopathies and preimplantation diagnostics. *International Journal of Laboratory Hematology* **44**, 21–27 (2022).
18. Forget, B. G. & Bunn, H. F. Classification of the disorders of hemoglobin. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* **3**, a011684–a011684 (2013).
19. Cooley, T. B. Anemia in children. *American Journal of Diseases of Children* **34**, 347 (1927).
20. Olivieri, N. F. The β -Thalassemias. *New England Journal of Medicine* **341**, 99–109 (1999).
21. Nussbaum, R. L. *Thompson & Thompson Genetics in Medicine*. (Elsevier, 2016).
22. Shang, X. & Xu, X. Update in the genetics of thalassemia: what clinicians need to know. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology* **39**, 3–15 (2017).
23. Farashi, S. & Hartevelde, C. L. Molecular basis of α -thalassemia. *Blood Cells, Molecules, and Diseases* **70**, 43–53 (2018).
24. Sarnaik, S. A. Thalassemia and related hemoglobinopathies. *The Indian Journal of Pediatrics* **72**, 319–324 (2005).
25. Hartevelde, C. L. & Higgs, D. R. α -thalassaemia. *Orphanet Journal of Rare Diseases* **5**, 13 (2010).
26. Williams, T. N. & Thein, S. L. Sick cell anemia and its phenotypes. *Annual Review of Genomics and Human Genetics* **19**, 113–147 (2018).

27. Novelli, E. M. & Gladwin, M. T. Crises in sickle cell disease. *Chest* **149**, 1082–1093 (2016).
28. Herrick, J. B. Peculiar elongated and sickle-shaped red blood corpuscles in a case of severe anemia. 1910. *Yale Journal of Biology and Medicine* **74**, 179–84 (2001).
29. Ingram, V. M. Gene mutations in human haemoglobin: the chemical difference between normal and sickle cell haemoglobin. *Nature* **180**, 326–328 (1957).
30. Mestre, H. *et al.* Cerebrospinal fluid influx drives acute ischemic tissue swelling. *Science (1979)* **367**, 1198–1199 (2020).
31. Conway O'Brien, E., Ali, S. & Chevassut, T. Sickle cell disease: an update. *Clinical Medicine* **22**, 218–220 (2022).
32. Pule, G. D. *et al.* Beta-globin gene haplotypes and selected malaria-associated variants among black Southern African populations. *Global Health Epidemiology and Genomics* **2**, e17 (2017).
33. Shriner, D. & Rotimi, C. N. Whole-genome-sequence-based haplotypes reveal single origin of the sickle allele during the holocene wet phase. *The American Journal of Human Genetics* **102**, 547–556 (2018).
34. Williams, T. N. & Thein, S. L. Sickle cell anemia and its phenotypes. *Annual Review of Genomics Human Genetics* **19**, 113–147 (2018).
35. Rees, D. C., Brousse, V. A. M. & Brewin, J. N. Determinants of severity in sickle cell disease. *Blood Reviews* **56**, 100983 (2022).
36. The Lancet Haematology. Sickle cell disease: a year in review. *The Lancet Haematology* **9**, e385 (2022).
37. The Lancet Global Health. Homing in on haemoglobinopathies. *The Lancet Global Health* **10**, e1 (2022).
38. Mandal, A. K., Mitra, A. & Das, R. Sickle cell hemoglobin. *Subcellular Biochemistry* vol. 94 297–322 (Springer, 2020).
39. Bunn, H. F. Pathogenesis and treatment of sickle cell disease. *New England Journal of Medicine* **337**, 762–769 (1997).

40. Eaton, W. A. Hemoglobin S polymerization and sickle cell disease: a retrospective on the occasion of the 70th anniversary of Pauling's *Science* paper. *American Journal of Hematology* **95**, 205–211 (2020).
41. Steinberg, M. H. Sickle cell anemia, the first molecular disease: overview of molecular etiology, pathophysiology, and therapeutic approaches. *The Scientific World Journal* **8**, 1295–1324 (2008).
42. Kato, G. J. *et al.* Sickle cell disease. *Nature Reviews Disease Primers* **4**, 18010 (2018).
43. Sundd, P., Gladwin, M. T. & Novelli, E. M. Pathophysiology of sickle cell disease. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* **14**, 263–292 (2019).
44. Rees, D. C., Williams, T. N. & Gladwin, M. T. Sickle-cell disease. *The Lancet* **376**, 2018–2031 (2010).
45. Gardner, R. V. Sickle cell disease: advances in treatment. *Ochsner Journal* **18**, 377–389 (2018).
46. Aich, A., Jones, M. K. & Gupta, K. Pain and sickle cell disease. *Current Opinion in Hematology* **26**, 131–138 (2019).
47. Piccin, A. *et al.* Insight into the complex pathophysiology of sickle cell anaemia and possible treatment. *European Journal of Haematology* **102**, 319–330 (2019).
48. Neumayr, L. D., Hoppe, C. C. & Brown, C. Sickle cell disease: current treatment and emerging therapies. *American Journal of Managed Care* **25**, S335–S343 (2019).
49. Ballas, S. K. & Darbari, D. S. Review/overview of pain in sickle cell disease. *Complementary Therapies in Medicine* **49**, 102327 (2020).
50. Sagi, V., Mittal, A., Tran, H. & Gupta, K. Pain in sickle cell disease: current and potential translational therapies. *Translational Research* **234**, 141–158 (2021).
51. Bender, M. & Carlberg, K. Sickle cell disease. *GeneReviews*® (1993).
52. Booth, C., Inusa, B. & Obaro, S. K. Infection in sickle cell disease: a review. *International Journal of Infectious Diseases* **14**, e2–e12 (2010).

53. Álvarez, O. & Wietstruck, M. A. Sickle cell disease. *Pediatric Respiratory Diseases* 529–541 (Springer International Publishing, Cham, 2020).
54. Kato, G. J., Gladwin, M. T. & Steinberg, M. H. Deconstructing sickle cell disease: reappraisal of the role of hemolysis in the development of clinical subphenotypes. *Blood Reviews* **21**, 37–47 (2007).
55. Sopterj. Dia mundial da hipertensão pulmonar: conscientização dos desafios e dificuldades a serem superados. <https://www.sopterj.com.br/dia-mundial-da-hipertensao-pulmonar-conscientizacao-dos-desafios-e-dificuldades-a-serem-superados> (2022).
56. Gordeuk, V. R., Castro, O. L. & Machado, R. F. Pathophysiology and treatment of pulmonary hypertension in sickle cell disease. *Blood* **127**, 820–828 (2016).
57. Galiè, N., McLaughlin, V. V., Rubin, L. J. & Simonneau, G. An overview of the 6th world symposium on pulmonary hypertension. *European Respiratory Journal* **53**, 1802148 (2019).
58. Onyeaka, H. K. *et al.* Impact of depression in sickle cell disease hospitalization-related outcomes: an analysis of the national inpatient sample (NIS). *Medicina (Buenos Aires)* **55**, 385 (2019).
59. Pecker, L. H. & Darbari, D. S. Psychosocial and affective comorbidities in sickle cell disease. *Neuroscience Letters* **705**, 1–6 (2019).
60. Meier, E. R. Treatment options for sickle cell disease. *Pediatric Clinics of North America* **65**, 427–443 (2018).
61. Park, S. H. & Bao, G. CRISPR/Cas9 gene editing for curing sickle cell disease. *Transfusion and Apheresis Science* **60**, 103060 (2021).
62. Kapoor, S., Little, J. A. & Pecker, L. H. Advances in the treatment of sickle cell disease. *Mayo Clinic Proceedings* **93**, 1810–1824 (2018).
63. Blair, H. A. Crizanlizumab: first approval. *Drugs* **80**, 79–84 (2020).
64. Hoppe, C. & Neumayr, L. Sickle cell disease. *Hematology Oncology Clinics North Am* **33**, 355–371 (2019).

65. Darbari, D. S., Sheehan, V. A. & Ballas, S. K. The vaso-occlusive pain crisis in sickle cell disease: definition, pathophysiology, and management. *European Journal of Haematology* **105**, 237–246 (2020).
66. Brandow, A. M. & Liem, R. I. Advances in the diagnosis and treatment of sickle cell disease. *Journal of Hematology & Oncology* **15**, 20 (2022).
67. Waldron, E. & Tanhehco, Y. C. Under the hood: the molecular biology driving gene therapy for the treatment of sickle cell disease. *Transfusion and Apheresis Science* **61**, 103566 (2022).
68. Yesilipek, M. A. Hematopoietic stem cell transplantation in patients with hemoglobinopathies. *Hemoglobin* **44**, 377–384 (2020).
69. Gardner, R. V. Sickle cell disease: advances in treatment. *Ochsner Journal* **18**, 377–389 (2018).
70. Luthra, R., Kaur, S. & Bhandari, K. Applications of CRISPR as a potential therapeutic. *Life Sciences* **284**, 119908 (2021).
71. Thein, S. L. Genetic association studies in β -hemoglobinopathies. *Hematology* **2013**, 354–361 (2013).
72. Thein, S. L. & Menzel, S. Discovering the genetics underlying foetal haemoglobin production in adults. *British Journal of Haematology* **145**, 455–467 (2009).
73. Sankaran, V. G. & Weiss, M. J. Anemia: progress in molecular mechanisms and therapies. *Nature Medicine* **21**, 221–230 (2015).
74. Delgado, M., Ginete, C., Santos, B., Miranda, A. & Brito, M. Genotypic diversity among angolan children with sickle cell anemia. *International Journal of Environmental Research and Public Health* **18**, 5417 (2021).
75. Steinberg, M. H. Fetal hemoglobin in sickle cell anemia. *Blood* **136**, 2392–2400 (2020).
76. Bhanushali, A. A., Himani, K., Patra, P. K. & Das, B. R. Hb F levels in Indian sickle cell patients and association with the HBB locus variants 10128556 (C>T), and the HBG XmnI (Arab-Indian) Variant. *Hemoglobin* **41**, 317–320 (2017).

77. Habara, A. H., Shaikho, E. M. & Steinberg, M. H. Fetal hemoglobin in sickle cell anemia: the Arab-Indian haplotype and new therapeutic agents. *American Journal of Hematology* **92**, 1233–1242 (2017).
78. Gordeuk, V. R. *et al.* The CYB5R3c.350C>G and G6PD A alleles modify severity of anemia in malaria and sickle cell disease. *American Journal Hematology* **95**, 1269–1279 (2020).
79. Fuller, T. D. *et al.* Genetic variation in CYB5R3 is associated with methemoglobin levels in preterm infants receiving nitric oxide therapy. *Pediatric Research* **77**, 472–476 (2015).
80. Dean, L. & Kane, M. Rasburicase therapy and G6PD and CYB5R genotype. *Medical Genetics Summaries* (2012).
81. Al-Abdulmalek, A., Al-Sulaiman, R., Abu-Tineh, M. & Yassin, M. A. Congenital methemoglobinemia: first confirmed case in the Arab population with a novel variant in the CYB5R Gene in the State of Qatar: A Case Report. *Journal of Blood Medicine* **Volume 14**, 247–251 (2023).
82. Hall, R., Yuan, S., Wood, K., Katona, M. & Straub, A. C. Cytochrome b5 reductases: redox regulators of cell homeostasis. *Journal of Biological Chemistry* **298**, 102654 (2022).
83. Ullah, A. *et al.* Molecular dynamic simulation analysis of a novel missense variant in CYB5R3 gene in patients with methemoglobinemia. *Medicina (Buenos Aires)* **59**, 379 (2023).
84. Gupta, V. *et al.* Mutation update: variants of the CYB5R3 gene in recessive congenital methemoglobinemia. *Human Mutation* **41**, 737–748 (2020).
85. Siendones, E., Ballesteros, M. & Navas, P. Cellular and molecular mechanisms of recessive hereditary methaemoglobinaemia type II. *Journal of Clinical Medicine* **7**, 341 (2018).
86. Jenni, S. *et al.* Methemoglobinemia, increased deformability and reduced membrane stability of red blood cells in a cat with a CYB5R3 splice defect. *Cells* **12**, 991 (2023).

87. Santos, B. *et al.* Co-Inheritance of alpha-thalassemia and sickle cell disease in a cohort of Angolan pediatric patients. *Molecular Biology Reports* **47**, 5397–5402 (2020).
88. Powledge, T. M. The polymerase chain reaction. *Advances in Physiology Education* **28**, 44–50 (2004).
89. Ehtisham, M., Wani, F., Wani, I., Kaur, P. & Nissar, S. Polymerase chain reaction (PCR): back to basics. *Indian Journal of Contemporary Dentistry* **4**, 30 (2016).
90. Mullis, K. *et al.* Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* **51**, 263–273 (1986).
91. Cotter, F. E. The role of polymerase chain reaction in pathology. *Journal of Histotechnology* **17**, 253–259 (1994).
92. Tan, A. S.-C., Quah, T. C., Low, P. S. & Chong, S. S. A rapid and reliable 7-deletion multiplex polymerase chain reaction assay for α -thalassemia. *Blood* **98**, 250–251 (2001).
93. Chaudhary, R. & Maurya, G. K. Restriction fragment length polymorphism. *Encyclopedia of Animal Cognition and Behavior* 1–3 (Springer International Publishing, Cham, 2019).
94. Moreira, C. Enzima de restrição. *Revista de Ciência Elementar* **2**, (2014).
95. Chuang, L.-Y. *et al.* Restriction enzyme mining for SNPs in genomes. *Anticancer Research* **28**, 2001–7 (2008).
96. Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **74**, 5463–5467 (1977).
97. Verma, M., Kulshrestha, S. & Puri, A. Genome sequencing. *Bioinformatics* (ed. Keith, J. M.) vol. 1 3–33 (Humana Press, 2017).
98. Crossley, B. M. *et al.* Guidelines for Sanger sequencing and molecular assay monitoring. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* **32**, 767–775 (2020).

99. Martins, M. C., Olim, G., Melo, J., Magalhaes, H. A. & Rodrigues, M. O. Hereditary anaemias in Portugal: epidemiology, public health significance, and control. *Journal of Medical Genetics* **30**, 235–239 (1993).
100. Lavinha, J. *et al.* Importation route of the sickle cell trait into Portugal: contribution of molecular epidemiology. *Human Biology* **64**, 891–901 (1992).
101. Thachil, J., Owusu-Ofori, S. & Bates, I. Haematological diseases in the tropics. *Manson's Tropical Infectious Diseases* 894-932.e7 (Elsevier, 2014).
102. Direção-geral da saúde. *Norma da direção-geral da saúde*. www.dgs.pt (2011).
103. World health organization. *Haemoglobin Concentrations for the Diagnosis of Anaemia and Assessment of Severity*. (2011).
104. Peres, M. J. *et al.* Molecular basis of α -thalassa in Portugal. *Hemoglobin* **19**, 343–352 (1995).
105. Souza, R. A. V. de *et al.* α -thalassemia: genotypic profile associated with ethnicity and hematological differentiation of iron deficiency anemia in the region of uberaba, Minas Gerais, Brazil. *Hemoglobin* **39**, 264–269 (2015).
106. Cai, W. *et al.* Prevalence and genetic analysis of thalassemia in neonates in Wuhan area: a national megacity in central China. *Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine* **34**, 2240–2247 (2021).
107. Shahid, S. *et al.* Alpha thalassemia deletions found in suspected cases of beta thalassemia major in Pakistani population. *Pakistan Journal of Medical Sciences* **33**, 411–416 (2017).
108. Munkongdee, T. *et al.* Molecular epidemiology of hemoglobinopathies in cambodia. *Hemoglobin* **40**, 163–167 (2016).
109. Purohit, P., Dehury, S., Patel, S. & Patel, D. K. Prevalence of deletional alpha thalassemia and sickle gene in a tribal dominated malaria endemic area of eastern india. *ISRN Hematology* **2014**, 1–6 (2014).
110. Abuamer, S. *et al.* Frequencies and phenotypic consequences of association of α - and β -thalassemia alleles with sickle-cell disease in Bahrain. *International Journal of Laboratory Hematology* **39**, 76–83 (2017).

111. Rumaney, M. B. *et al.* The co-inheritance of alpha-thalassemia and sickle cell anemia is associated with better hematological indices and lower consultations rate in cameroonian patients and could improve their survival. *PLoS One* **9**, e100516 (2014).
112. Azarkeivan, A., Cohan, N., Niazkar, H. R., Azizi, A. & Rad, F. Hb S (HBB: c.20A>T) and α - and β -Thalassemia coinheritance in iranian patients. *Hemoglobin* **44**, 109–112 (2020).
113. Belisário, A. R., Rodrigues, C. V., Martins, M. L., Silva, C. M. & Viana, M. B. Coinheritance of α -thalassemia decreases the risk of cerebrovascular disease in a cohort of children with sickle cell anemia. *Hemoglobin* **34**, 516–529 (2010).
114. Gueye Tall, F. *et al.* Combined and differential effects of alpha-thalassemia and HbF-quantitative trait loci in Senegalese hydroxyurea-free children with sickle cell anemia. *Pediatric Blood Cancer* **66**, (2019).
115. Santos, B. *et al.* Co-Inheritance of alpha-thalassemia and sickle cell disease in a cohort of Angolan pediatric patients. *Molecular Biology Reports* **47**, 5397–5402 (2020).
116. Li, Y. & Graubard, B. I. Testing Hardy-Weinberg equilibrium and homogeneity of Hardy-Weinberg disequilibrium using complex survey data. *Biometrics* **65**, 1096–1104 (2009).
117. Mayo, O. A Century of Hardy–Weinberg equilibrium. *Twin Research and Human Genetics* **11**, 249–256 (2008).
118. World health organization. Anaemia. https://www.who.int/health-topics/anaemia#tab=tab_1 (2017).
119. Sachdev, V., Rosing, D. R. & Thein, S. L. Cardiovascular complications of sickle cell disease. *Trends Cardiovascular Medicine* **31**, 187–193 (2021).
120. Al-Allawi, N. *et al.* The association of HBG2, BCL11A, and HMIP polymorphisms with fetal hemoglobin and clinical phenotype in Iraqi Kurds with sickle cell disease. *International Journal of Laboratory Hematology* **41**, 87–93 (2019).

121. Fong, C., Mendoza, Y. & Barreto, G. Genetic variants in the G gamma-globin promoter modulate fetal hemoglobin expression in the Colombian population. *Genetics and Molecular Biology* **43**, (2020).
122. Starlard-Davenport, A., Gu, Q. & Pace, B. S. Targeting genetic modifiers of HBG gene expression in sickle cell disease: the miRNA option. *Molecular Diagnosis & Therapy* **26**, 497–509 (2022).
123. Nongbri, S. R. L., Verma, H. K., Lakkakula, B. V. K. S. & Patra, P. K. Presence of atypical beta globin (HBB) gene cluster haplotypes in sickle cell anemia patients of India. *Revista Brasileira Hematologia e Hemoterapia* **39**, 180–182 (2017).
124. Steinberg, M. H., Kumar, S., Murphy, G. J. & Vanuytsel, K. Sickle cell disease in the era of precision medicine: looking to the future. *Expert Review of Precision Medicine and Drug Development* **4**, 357–367 (2019).
125. Wood, K. C. *et al.* Smooth muscle cytochrome b5 reductase 3 deficiency accelerates pulmonary hypertension development in sickle cell mice. *Blood Advances* **3**, 4104–4116 (2019).
126. Durgin, B. G. *et al.* Smooth muscle cell CYB5R3 preserves cardiac and vascular function under chronic hypoxic stress. *Journal Molecular and Cellular Cardiology* **162**, 72–80 (2022).
127. Nicolau, M. *et al.* Genetic modulators of fetal hemoglobin expression and ischemic stroke occurrence in African descendant children with sickle cell anemia. *Annals Hematology* **98**, 2673–2681 (2019).
128. Percy, M. J. *et al.* Familial idiopathic methemoglobinemia revisited: original cases reveal 2 novel mutations in NADH-cytochrome b5 reductase. *Blood* **100**, 3447–3449 (2002).
129. Kedar, P. S., Gupta, V., Warang, P., Chiddarwar, A. & Madkaikar, M. Novel mutation (R192C) in CYB5R3 gene causing NADH-cytochrome b5 reductase deficiency in eight Indian patients associated with autosomal recessive congenital methemoglobinemia type-I. *Hematology* **23**, 567–573 (2018).

7 Anexos

Tabela 7.1. Identificação, concentração e conteúdo em CG dos *primers* usados no *Multiplex Gap-PCR* para detecção das deleções α 3,7 e α 4,2

Polimorfismo	<i>Primer</i>	
	Identificação dos <i>primers</i> e concentração	Sequência (5'→3') e conteúdo em CG
Deleções α 3,7Kb e α 4,2Kb	3.7/20.5-R (<i>primer</i> reverso) (25pmol/ μ L)	AAA GCA TCT TAG GGT CCA GCG %CG: 52
	α 2/3.7-F (<i>primer</i> direto) (25pmol/ μ L)	CCC CTC GCC AAG TCC ACC C %CG: 74
	α 2-R (<i>primer</i> reverso) (25pmol/ μ L)	AGA CCA GGA AGG GCC GGT G %CG: 68
	4.2-F (<i>primer</i> direto) (25pmol/ μ L)	GGT TTA CCC ATG TGG TGC CTC %CG:57
	4.2-R (<i>primer</i> reverso) (25pmol/ μ L)	CCC GTT GGA TCT TCT CAT TTC CC %CG: 52

Adaptado de Tan *et al.* 2001⁹²

Tabela 7.2. Reagentes e condições de *Multiplex Gap-PCR* e de eletroforese para a detecção simultânea das deleções α -talassêmicas de 3,7kb e 4,2kb localizadas no agrupamento gênico da α -globina

Polimorfismo	Mistura de reação (Para 1 reação)		Condições de PCR			Condições da eletroforese		
	Reagentes	Volume (μ L)	Temperatura ($^{\circ}$ C)	Tempo	Ciclos	Gel de agarose	Tempo (min)	Voltagem
Deleções α3,7Kb e α4,2Kb	Água bidestilada	14,90	96	15min	1	1g de agarose SeaKem®	90	70
	dNTPs (2,5mM cada)	4,00						
	<i>Primer α2/3.7-F</i> (25 pmol/ μ L)	1,00	98	45seg	30	100mL de TBE (1x)		
	<i>Primer 3.7/20.5-R</i> (25 pmol/ μ L)	0,50						
	<i>Primer α2-R</i> (25 pmol/ μ L)	0,50	64	90seg	30	100mL de TBE (1x)		
	<i>Primer 4.2-F</i> (25 pmol/ μ L)	0,50						
	<i>Primer 4.2-R</i> (25 pmol/ μ L)	0,50	72	120seg	1	4 μ L de brometo de etídio		
	BSA (10 mg/mL)	0,35						
	TaKaRa LA Taq Hs (1,25 U/ μ L)	0,25	72	5min	1	4 μ L de brometo de etídio		
	DNA (~15ng/ μ L)	1,00	4	pausa	-			

Tabela 7.3. Identificação, concentração e conteúdo em CG dos *primers* para detecção do polimorfismo rs7482144

Polimorfismo	<i>Primer</i>	
	Identificação dos <i>primers</i> e concentração	Sequência (5'→3') e conteúdo em CG
SNP rs7482144	R160S (<i>primer</i> direto) (25pmol/μL)	GCA CTG AAA CTG TTG CTT TAT AGG AT %CG: 38
	R161 (<i>primer</i> reverso) (25pmol/μL)	TGG CGT CTG GAC TAG GAG CTT ATT %CG: 50

Tabela 7.4. Reagentes e condições de PCR para amplificação do promotor do gene *HBG2*

Gene	Mistura de reação (Para 1 reação)		Condições de PCR			Condições da eletroforese			Tamanho do fragmento
	Reagentes	Volume (μ L)	Temperatura ($^{\circ}$ C)	Tempo	Ciclos	Gel de agarose	Tempo (min)	Voltagem	
<i>HBG2</i>	Tampão B	22,90	94	5min	1	2g de agarose SeaKem®	60	70	677pb
	<i>Primer</i> R160S (25pmol/ μ L)	0,50	94	40seg	28				
	<i>Primer</i> R161 (25pmol/ μ L)	0,50	55	40seg		100mL de TBE (1x)			
			72	50seg					
	AmpliTaq DNA Polimerase (5U/ μ L)	0,10	72	10min	1	4 μ L de brometo de etídio			
DNA (~40ng/ μ L)	1,00	4	pausa	-					

Tabela 7.5. Reagentes e condições de restrição da enzima *Xmn* I para detecção do polimorfismo rs7482144 localizado a montante do gene *HBG2*

Gene	Polimorfismo	Mistura de reação (Para 1 reação)		Condições de Reação		Fragmento resultante		Sítio de corte do enzima de restrição <i>Xmn</i> I
		Reagente	Volume (μ L)	Temperatura ($^{\circ}$ C)	Tempo	Alelo <i>Wild Type</i>	Alelo Variante	
<i>HBG2</i>	SNP rs7482144	Água bidestilada	7,00	37	<i>overnight</i>	C	T	5'...GAANN/NNTTC...3' 3'...CTTNN/NNAAG...5'
		Enzima <i>Xmn</i> I (20U/ μ L) (NEB®)	1,00			677	462	
		Produto amplificado por PCR	12,00				215	

Tabela 7.6. Identificação, concentração e conteúdo em CG dos *primers* para detecção do polimorfismo rs1800457 no gene *CYB5R3*

Polimorfismo	<i>Primer</i>	
	Identificação dos <i>primers</i> e concentração	Sequência (5'→3') e conteúdo em CG
SNP rs1800457	EX5F (<i>primer</i> direto) (25pmol/μL)	GTA CAC GAG GCT GGT GGT TT %CG: 55
	EX5R (<i>primer</i> reverso) (25pmol/μL)	AGC TGG CCT GAC GAG AGT C %CG: 63

Tabela 7.7. Reagentes e condições de PCR para detecção do polimorfismo rs1800457 localizado no gene *CYB5R3*

Gene	Mistura de reação (Para 1 reação)		Condições de PCR			Condições da eletroforese			Tamanho do fragmento
	Reagentes	Volume (μL)	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Tempo	Ciclos	Gel de agarose	Tempo (min)	Voltagem	
<i>CYB5R3</i>	Tampão B	22,90	94	5min	1	2g de agarose SeaKem®	60	70	500pb
	<i>Primer</i> EX5F (25pmol/ μL)	0,50	94	30seg	30				
	<i>Primer</i> EX5R (25pmol/ μL)	0,50	60	30seg		100mL de TBE (1x)			
			72	30seg					
	AmpliTaq DNA Polimerase (5U/ μL)	0,10	72	5min	1	4 μL de brometo de etídio			
DNA (~40ng/ μL)	1,00	4	pausa	-					

Adaptado de: Percy, M. J. *et al* 2002¹²⁸ e Kedar, P. S. *et al* 2018¹²⁹

Tabela 7.8. Composição dos tampões de PCR e de eletroforese

Tampões		
Tampão de PCR - B		Tampão de Eletroforese
Solução Stock	Solução Trabalho	(TBE 10x)
KCl2 2M – 50 mM		EDTA – 75µL
Tris-HCl 1,5 M (pH = 8.8) – 100 Mm	Solução Stock – 0,5 mL	Glicerol – 18,75 µL
MgCl2 1 M – 15 mM	H2O – 4,5 mL	H2O – 8,75 µL
Gelatina – 0,1%	dNTPs 100mM – 40 µL	Azul de bromofenol – 0,22g
H2O – 26,73 mL		NaOH

Tabela 7.9. Aminoácidos e respectivos símbolos IUPAC - IUBMB

Aminácido	Símbolo IUPAC - IUBMB	Símbolo
Alanina	Ala	A
Ácido Aspártico	Asp	D
Ácido glutâmico	Glu	E
Arginina	Arg	R
Asparagina	Asn	N
Cisteína	Cys	C
Fenilalanina	Phe	F
Glicina	Gly	G
Glutamina	Gln	Q
Histidina	His	H
Isoleucina	Ile	I
Leucina	Leu	L
Lisina	Lys	K
Metionina	Met	M
Prolina	Pro	P
Serina	Ser	S
Tirosina	Tyr	Y
Treonina	Thr	T
Triptofano	Trp	W
Valina	Val	V

Tabela 7.10. Código genético. Correspondência entre o tripleto de nucleótidos (codão) de mRNA e o aminoácido equivalente

	U		C		A		G		
U	UUU	Fen	UCU	Ser	UAU	Tir	UGU	Cis	U
	UUC	Fen	UCC		UAC	Tir	UGC	Cis	C
	UUA	Leu	UCA		UAA	STOP**	UGA	STOP**	A
	UUG	Leu	UCG		UAG	STOP**	UGG	Trp	G
C	CUU	Leu	CCU	Pro	CAU	His	CGU	Arg	U
	CUC		CCC		CAC	His	CGC		C
	CUA		CCA		CAA	Gln	CGA		A
	CUG		CCG		CAG	Gln	CGG		G
A	AUU	Ile	ACU	Tre	AAU	Asn	AGU	Ser	U
	AUC	Ile	ACC		AAC	Asn	AGC	Ser	C
	AUA	Ile	ACA		AAA	Lis	AGA	Arg	A
	AUG	Met*	ACG		AAG	Lis	AGG	Arg	G
G	GUU	Val	GCU	Ala	GAU	Asp	GGU	Gli	U
	GUC		GCC		GAC	Asp	GGC		C
	GUA		GCA		GAA	Glu	GGA		A
	GUG		GCG		GAG	Glu	GGG		G

* Codão que assinala a iniciação da síntese de uma proteína e que poderá também ser incorporado nas cadeias.

**STOP – não há inserção de qualquer aminoácido e provoca o fim da síntese proteica.