

V. Discussão

1. VARIANTES DESCRITAS

1.1 CASO CLÍNICO 1

Indivíduo I

O estudo das Hbs do indivíduo I, por HPLC de troca catiónica, revelou a presença de um pico desconhecido com um tempo de retenção similar ao da Hb A₂ (Figura 8). A sequenciação mostrou a presença da seguinte mutação $\alpha 12(\text{A10})(\text{Ala} \rightarrow \text{Asp})(\text{GCC} > \text{GAC}) (\alpha 2)$, em heterozigotia (Figura 9). Esta pode ocorrer também no gene $\alpha 1$ e encontra-se descrita na literatura como Hb J-Paris-I ou Hb J-Aljezur.

Os estudos *in silico* para a mutação revelaram resultados não concordantes. O SIFT prevê que a mutação afete a função da Hb, já o Polyphen-2 afirma o contrário.

De acordo com a informação inserida na base de dados HbVar, a Hb J-Paris-I foi identificada inicialmente em famílias de origem espanhola, portuguesa, iraniana e jugoslava. Os indivíduos portadores da mutação ($\alpha^T\alpha/\alpha\alpha$ ou $\alpha\alpha^T/\alpha\alpha$) são assintomáticos, apresentando parâmetros hematológicos normais (McCormack *et al*, 1986).

A Hb J-Paris-I é detetada por HPLC de troca catiónica, correspondendo a aproximadamente 26.6% da Hb total. O indivíduo I apresentou 25.8% de Hb J-Paris-I (Figura 8). Esta variante apresenta um tempo de retenção similar ao da Hb A_{1c}.

A substituição $\underline{GCC} > \underline{GAC}$ no codão 12, ocorre na hélice A10, na parte externa da Hb. A substituição de uma alanina por um ácido aspártico resulta na substituição de um aminoácido alifático e apolar por um aminoácido carregado negativamente a pH 7 (Figura 41). De acordo com estudos anteriores, a troca de aminoácidos que caracteriza a Hb J-Paris-I ocorre numa zona que não é importante para a estrutura e função da Hb. Verificou-se também que a Hb J-Paris-I é uma Hb estável, não apresentando diferenças a nível estrutural e funcional quando comparado com a Hb A. Desta forma, a mutação não afeta a função da Hb como era previsto pelo *software* Polyphen-2.

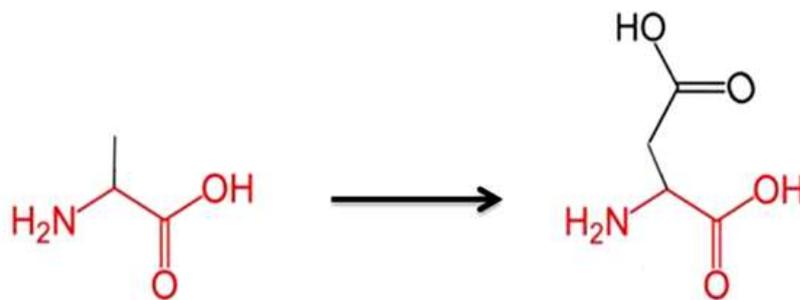


Figura 41: Substituição de uma alanina por um ácido aspártico. A vermelho encontra-se ilustrada a constituição que é fixa em todos os aminoácidos e a vermelho o grupo variável (grupo R).

No codão 12 não se encontram descritas outras variantes de Hb.

1.2. CASO CLÍNICO 2

Indivíduo II

A sequenciação do gene HBA2 do indivíduo II mostrou a presença da seguinte mutação $\alpha 43(\text{CE1})(\text{Phe} \rightarrow \text{Leu})(\text{TTC} \rightarrow \text{TTG}) (\alpha 2)$, em heterozigotia. Esta encontra-se descrita na literatura e é conhecida por Hb Hirosaki.

Os estudos *in silico* para a mutação revelaram resultados concordantes. O SIFT e o Polyphen-2 preveem que a mutação afete a função da Hb.

De acordo com a informação inserida na base de dados HbVar, a Hb Hirosaki foi inicialmente identificada em indivíduos de origem japonesa. Os indivíduos portadores da mutação ($\alpha^T\alpha/\alpha\alpha$) podem apresentar alguns parâmetros hematológicos alterados, associados principalmente a anemia hemolítica. Tem-se verificado diferenças na severidade do fenótipo apresentado por adultos e crianças. Os adultos portadores apresentam sintomas ligeiros, tais como fadiga. Por outro lado, as crianças apresentam sintomas mais severos, tais como, crises hemolíticas e cianose (Yokoyama *et al*, 1981, Tanaka *et al*, 2005). Em heterozigotia, a Hb Hirosaki corresponde a aproximadamente 10% da Hb total de um indivíduo.

A substituição $\text{TTC} \rightarrow \text{TTG}$ no codão 43 ocorre na dobra CE1, no contato heme. A substituição de uma fenilalanina por uma leucina resulta na substituição de um aminoácido aromático relativamente apolar por um aminoácido alifático e apolar (Figura 42). De acordo com estudos anteriores a troca de aminoácidos que caracteriza a Hb Hirosaki ocorre numa zona importante para a estrutura e função da Hb. O resíduo Phe43 mantém o grupo heme na posição correta, de forma que este interaja

eficientemente com a cadeia globínica respetiva (Préhu *et al*, 2009). A substituição deste aminoácido por outro com diferentes características pode causar a destabilização da interação da fenilalanina com o grupo heme e conseqüentemente a ligação do grupo heme à cadeia globínica.

A Hb Hirosaki é uma Hb instável. Possivelmente após a biossíntese das cadeias globínicas mutadas ocorre uma rápida desnaturação e degradação das mesmas, as quais podem se encontrar já na forma de dímeros (α_2^T) ou tetrâmeros ($\alpha_2^T\beta_2$) instáveis (Tanaka *et al*, 2005). Estes podem sofrer precipitação dentro dos eritrócitos na forma de inclusões insolúveis ou corpos Heinz, quando submetidas a *stress* oxidativo (Yokoyama *et al*, 1981, Wajcman *et al*, 2008, Préhu *et al*, 2009). Por outro lado pode-se verificar também a ocorrência de alterações na conformação da proteína no sentido da conformação com menor afinidade para o O₂ – desoxi-hemoglobina (Préhu *et al*, 2009). Tal como previsto pelos *softwares* SIFT e Polyphen-2 a mutação $\alpha 43(\text{CE1})(\text{Phe} \rightarrow \text{Leu})(\text{TTC} > \text{TTG}) (\alpha 2)$ afeta a função da Hb.

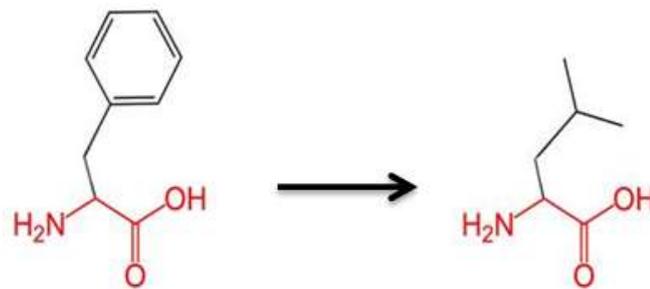


Figura 42: Substituição de uma fenilalanina por uma leucina. A vermelho encontra-se ilustrada a constituição que é fixa em todos os aminoácidos e a vermelho o grupo variável (grupo R).

Ao nível do codão 43 encontra-se descrita outra variante de Hb, a Hb Sens [$\alpha 43(\text{CE1})\text{Phe} \rightarrow \text{Ile}(\underline{\text{TTC}} > \underline{\text{ATC}}) (\alpha 2)$], que é também uma variante instável (Préhu *et al*, 2009).

1.3. CASO CLÍNICO 3

Indivíduo III

O estudo das Hbs do indivíduo III, por HPLC de troca catiónica, revelou a presença de um pico desconhecido com tempo de retenção igual ao tempo de retenção da Hb S (Figura 12). A sequenciação mostrou a presença da seguinte mutação $\alpha 74(\text{EF3})(\text{Asp} \rightarrow \text{Asn})(\underline{\text{GAC}} > \underline{\text{AAC}})$ ($\alpha 2$), em heterozigotia. Esta pode ocorrer também no gene $\alpha 1$ e é descrita na literatura como Hb G-Pest.

Os estudos *in silico* para a mutação revelaram resultados não concordantes. O SIFT prevê que a mutação afete a função da Hb, mas o Polyphen-2 afirma o contrário.

De acordo com a informação inserida na base de dados HbVar, a Hb G-Pest foi inicialmente identificada em famílias de origem húngara. Os indivíduos portadores da mutação ($\alpha^T \alpha / \alpha \alpha$ ou $\alpha \alpha^T / \alpha \alpha$) são assintomáticos, apresentando parâmetros hematológicos normais (Wenning *et al*, 2000).

A deteção da Hb G-Pest é possível por HPLC de troca catiónica. Embora esta variante apresente um tempo de retenção igual ao da Hb S, aparece em menor quantidade. O indivíduo III apresentou 13.7% de Hb Hirosaki (Figura 12).

A substituição $\underline{\text{GAC}} > \underline{\text{AAC}}$ no codão 74, ocorre na dobra EF3, na zona externa da Hb. A substituição de um ácido aspártico por uma asparagina resulta na substituição de um aminoácido carregado negativamente a pH 7, por um aminoácido carregado positivamente a pH 7 e polar (Figura 43). De acordo com estudos anteriores, a mutação que caracteriza a Hb G-Pest ocorre numa zona que não é importante para a estrutura e

função da Hb. Verificou-se também que a Hb G-Pest é uma Hb estável, não apresentando diferenças estruturais e funcionais quando comparado com a Hb A (Wenning *et al*, 2000). Desta forma, a mutação não afeta a função da Hb como era previsto pelo *software* Polyphen-2.

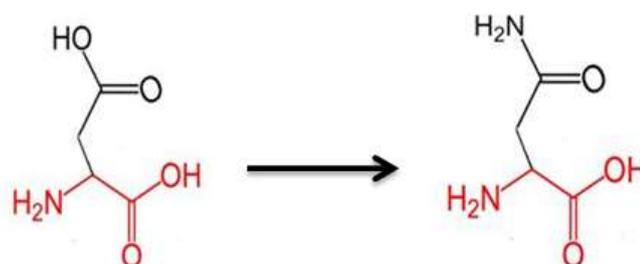


Figura 43: Substituição de um ácido aspártico por uma asparagina. A vermelho encontra-se ilustrada a constituição que se mantém em todos os aminoácidos e a vermelho o grupo variável (grupo R).

Ao nível do codão 74 encontram-se descritas quatro variantes de Hb, Hb Lille, Hb Les Lilas, Hb Chapel Hill e Hb Q-Thailand (Tabela 10). Apenas a variante Hb Chapel Hill apresenta um fenótipo de alta afinidade para o O₂ e uma ligeira instabilidade.

Tabela 10: Lista das variantes α descritas que ocorrem no codão 74.

Nome da Hb	Mutação	Zona da proteína	Fenótipo
Hb Lille	[α 74(EF3)Asp→Ala(GAC>GCC) (α 2 ou α 1)]	Externa	-
Hb Les Lilas	[α 74(EF3)Asp→Val(GAC>GTC) (α 1)]	Externa	-
Hb Chapel Hill	[α 74(EF3)Asp→Gly(GAC>GGC) (α 1)]	Externa	Levemente I, \uparrow O
Hb Q-Thailand	[α 74(EF3)Asp→His(GAC>CAC) (α 1)]	Externa	-

1.4 CASO CLÍNICO 4

Indivíduos IV-1, IV-3 e IV-4

O estudo das Hbs dos indivíduos IV-1, IV-3 e IV-4, por HPLC de troca catiónica, revelou a presença de níveis elevados de Hb A₂ (27%, 21% e 27% respetivamente), sugerindo a presença de uma variante de Hb com tempo de retenção igual ao da Hb A₂ (Tabela 5). A sequenciação mostrou a presença da seguinte mutação $\alpha 77(\text{EF6})\text{Pro}\rightarrow\text{His}(\text{CCC}\rightarrow\text{CAC}) (\alpha 2)$, em heterozigotia. Esta pode ocorrer também no gene $\alpha 1$ e encontra-se descrita na literatura como Hb Toulon.

Os estudos *in silico* para a mutação revelaram resultados não concordantes. O SIFT prevê que a mutação afete a função da Hb mas o Polyphen-2 afirma o contrário.

De acordo com a informação inserida na base de dados HbVar, a Hb Toulon foi inicialmente identificada em famílias de origem francesa. Os indivíduos portadores da mutação ($\alpha^T\alpha/\alpha\alpha$ ou $\alpha\alpha^T/\alpha\alpha$) são normalmente assintomáticos, apresentando parâmetros hematológicos normais (Wenning *et al.*, 2000). No nosso estudo verificou-se que a presença da mutação em heterozigotia causa uma ligeira diminuição dos valores VGM e HGM (Tabela 4).

A deteção da Hb Toulon é possível por HPLC de troca catiónica. Esta variante apresenta um tempo de retenção igual ao da Hb A₂ e surge em quantidades acima dos 20%, tal como se verificou para os indivíduos IV-1, IV-3 e IV-4 (Tabela 6).

A substituição $\text{CCC}\rightarrow\text{CAC}$ no codão 77 ocorre na dobra EF6, na zona externa da proteína. A substituição de uma prolina por uma histidina resulta na substituição de um

aminoácido alifático e apolar por um aminoácido carregado positivamente a pH 7 e polar (Figura 44). De acordo com estudos anteriores, a mutação que caracteriza a Hb Toulon ocorre numa zona que não é importante para a estrutura e função da Hb. Verificou-se também que a Hb Toulon é uma Hb estável e com afinidade de O₂ normal, não apresentando diferenças estruturais e funcionais quando comparado com a Hb A (Zwieten *et al.*, 2009). Desta forma, a mutação não afeta a função da Hb como era previsto pelo *software* Polyphen-2.

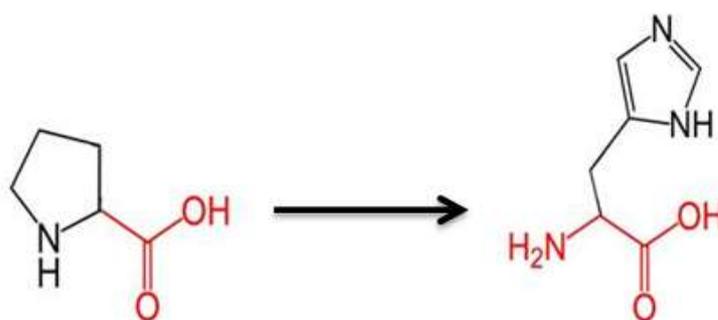


Figura 44: Substituição de uma prolina por uma histidina. A vermelho encontra-se ilustrada a constituição que se mantém em todos os aminoácidos e a vermelho o grupo variável (grupo R).

No codão 77 foi reportada a ocorrência de outras três mutações estruturais, Hb Asklipios, Hb Guizhou e Hb Nile (Tabela 11).

Tabela 11: Lista das variantes α descritas que ocorrem no codão 77.

Nome da Hb	Mutação	Zona da proteína	Fenótipo
Hb Asklipios	[α 77(EF6)Pro→Leu(CCC>CTC) (α 2)]	Externa	-
Hb Guizhou	[77(EF6)Pro→Arg(CCC>CGC) (α 2 ou α 1)]	Externa	-
Hb Nile	[α 77(EF6)Pro→Ser(CCC>TCC) (α 2 ou α 1)]	Externa	-

1.5 CASO CLÍNICO 5

Indivíduo V

O estudo das Hbs do indivíduo V, por HPLC de troca catiónica, revelou a presença de um pico desconhecido com tempo de retenção superior ao tempo de retenção para a Hb A₂ (Figura 15). A sequenciação mostrou a presença da seguinte mutação $\alpha 94(G1)Asp \rightarrow Tyr(\underline{GAC} > \underline{TAC}) (\alpha 2)$, em heterozigotia. Esta encontra-se descrita na literatura como Hb Setif.

Os estudos *in silico* para a mutação revelaram resultados concordantes. O SIFT e o Polyphen-2 preveem que a mutação afete a função da Hb.

De acordo com a informação inserida na base de dados HbVar, a Hb Setif foi identificada inicialmente em famílias de origem algeriana, iranese e libanesa. Os indivíduos portadores da mutação ($\alpha^T \alpha / \alpha \alpha$) em geral são assintomáticos e apresentam parâmetros hematológicos normais.

A Hb Setif é detetada por HPLC de troca catiónica, surgindo em quantidades próximas de 12-15%, tal como se verificou para o estudo do indivíduo V (13.7%) (Figura 15). Esta variante apresenta um tempo de retenção superior ao da Hb A₂.

A substituição $\underline{GAC} > \underline{TAC}$ no codão 94 ocorre na hélice G1, no contato $\alpha 1 \beta 2$. A substituição de um ácido aspártico por uma tirosina resulta na substituição de um aminoácido carregado negativamente a pH 7 por um aminoácido aromático relativamente apolar (Figura 45). De acordo com estudos anteriores a Hb Setif é uma Hb instável e apresenta baixa afinidade para o O₂ (Rahimi *et al.*, 2008, Rahimi *et al.*,

2010). Esta também pode causar cristalização de Hbs insolúveis e consequentemente originar eritrócitos falciformes (Rahimi *et al.*, 2008, Rahimi *et al.*, 2010, Charache *et al.*, 1987).

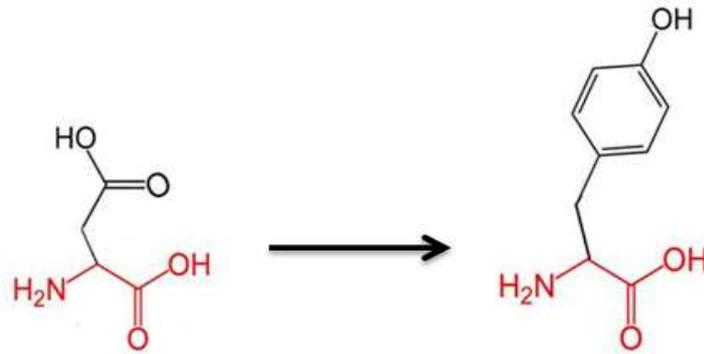


Figura 45: Substituição de um ácido aspártico por uma tirosina. A vermelho encontra-se ilustrada a constituição que se mantém em todos os aminoácidos e a vermelho o grupo variável (grupo R).

Em geral, a substituição de aminoácidos no contato $\alpha 1\beta 2$ afeta a função da Hb, pois este contato participa diretamente na ligação das moléculas de O_2 à Hb, de forma cooperativa. Desta forma, este controla também a afinidade da Hb para o O_2 (Shikama *et al.*, 2003). A substituição de aminoácidos nas hélices G pode afetar também o contato $\alpha 1\beta 1$ e a ligação da proteína AHSP às cadeias α (Favero *et al.*, 2011, Szolajska *et al.*, 2011). Muitas das variantes com fenótipo talassémico e instáveis apresentam mutações nas hélices G ao nível do contato $\alpha 1\beta 1$.

No caso da Hb Setif, verifica-se principalmente que a estabilidade do contato $\alpha 1\beta 2$ e a montagem da estrutura tetramérica da Hb podem estar alterados. Desta forma, a ligação de moléculas de O_2 à Hb vai ocorrer de forma diferente quando comparado com a Hb A normal. A Hb mutada apresenta uma afinidade reduzida, logo a ligação de O_2 à proteína

estará dificultada (Shikama *et al*, 2003). Tal como previsto pelos *softwares* SIFT e Polyphen-2 a mutação afeta a função da Hb.

No codão 94 encontram-se descritas outras seis mutações estruturais, Hb Titusville, Hb Sunshine Seth, Hb Bassett, Hb Kirksey, Hb Roanne e Hb Çapa (Tabela 12). Excluindo a Hb Kirksey, as restantes variantes apresentam fenótipo de baixa afinidade, tal como a Hb Setif.

Tabela 12: Lista das variantes α descritas que ocorrem no codão 94.

Nome da Hb	Mutação	Zona da proteína	Fenótipo
Hb Titusville	[α 94(G1)Asp→Asn(GAC>AAC) (α 2 ou α 1)]	Contato $\alpha_1\beta_2$	↓O
Hb Sunshine Seth	[α 94(G1)Asp→His(GAC>CAC) (α 2)]	Contato $\alpha_1\beta_2$	↓O, levemente I
Hb Bassett	[α 94(G1)Asp→Ala(GAC>GCC) (α 2 ou α 1)]	Contato $\alpha_1\beta_2$	↓O
Hb Kirksey	[α 94(G1)Asp→Val(GAC>GTC) (α 2)]	Contato $\alpha_1\beta_2$	-
Hb Roanne	[α 94(G1)Asp→Glu(GAC>GAG) (α 2 ou α 1)]	Contato $\alpha_1\beta_2$	↓O, levemente I
Hb Çapa	[α 94(G1)Asp→Gly(GAC>GGC) (α 1)]	Contato $\alpha_1\beta_2$	↓O, levemente I

1.6 CASO CLÍNICO 6

Indivíduo VI

O estudo das Hbs do indivíduo VI, por HPLC de troca catiónica, revelou a ausência de picos anormais (Figura 17). A sequenciação mostrou a presença da seguinte mutação $\alpha 119(\text{H2})\text{Pro}\rightarrow\text{Ser}(\underline{\text{CCT}}>\underline{\text{TCT}})$ ($\alpha 1$), em heterozigotia. Esta encontra-se descrita na literatura e é conhecida por Hb Groene Hart.

Os estudos *in silico* para a mutação revelaram resultados concordantes. O SIFT e o Polyphen-2 preveem que a mutação afete a função da Hb.

De acordo com a informação inserida na base de dados HbVar, a Hb Groene Hart foi identificada inicialmente em famílias italianas e marroquinas. A mutação pode surgir associada a ligeira microcitose e/ou anemia hemolítica.

A substituição $\underline{\text{CCT}}>\underline{\text{TCT}}$ no codão 119 ocorre na hélice H2, no contato $\alpha 1\beta 1$. A substituição de uma prolina por uma serina resulta na substituição de um aminoácido alifático e apolar, por um aminoácido polar e não carregado (Figura 46). De acordo com estudos anteriores, a mutação que caracteriza a Hb Groene Hart, resulta num fenótipo ligeiro de α -talassémia. O resíduo Pro119 participa diretamente na ligação da proteína AHSP às cadeias α e verificou-se também que as interações entre ambas (AHSP/ α -Hb) encontram-se diminuídas. Desta forma, é postulado que o fenótipo talassémico tenha origem na formação ineficiente de dímeros e conseqüentemente tetrâmeros, devido à presença de modificações no domínio das cadeias α que é reconhecido pela AHSP (Giordano et al., 2007, Zanella-Cleon et al., 2008). A mutação afeta assim a estabilidade, a formação e a montagem das cadeias α .

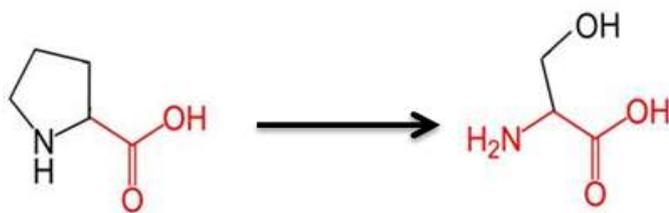


Figura 46: Substituição de uma prolina por uma serina. A vermelho encontra-se ilustrada a constituição que se mantém em todos os aminoácidos e a vermelho o grupo variável (grupo R).

Tal como previsto pelos *softwares* SIFT e Polyphen-2 a mutação afeta a função da Hb.

No codão 119 foi reportada a ocorrência de outra variante de Hb, a Hb Diamant. A Hb Diamant apresenta a mutação $\alpha 119(\text{H2})\text{Pro} \rightarrow \text{Leu}(\text{CCT} > \text{CTT}) (\alpha 1)$ e é uma variante com alta afinidade para o O_2 . Neste caso, o contato $\alpha 1\beta 1$ encontra-se perturbado, afetando a estabilidade da ligação de moléculas de O_2 à Hb.

1.7 CASO CLÍNICO 7

Indivíduos VII-1 a VII-23

O estudo de 308 indivíduos com hipocromia e microcitose revelou a presença de α -talassémia associada principalmente à deleção $\alpha^{3.7}$ em heterozigotia (38.64%) (Tabela 7). Verificou-se também que 23 indivíduos (7.47%) com fenótipo talassémico não apresentavam qualquer tipo de deleções mas a sequenciação do gene HBA1 revelou a presença de uma mutação pontual ($\alpha 125(\text{H8})(\text{Leu} \rightarrow \text{Arg})(\text{CTG} > \text{CGG}) (\alpha 1)$), em heterozigotia (Figura 19). Os 23 indivíduos apresentaram o fenótipo ($\alpha\alpha^T/\alpha\alpha$).

A mutação $\alpha 125(\text{H8})(\text{Leu} \rightarrow \text{Arg})(\text{CTG} > \text{CGG}) (\alpha 1)$ encontra-se descrita na literatura como Hb Plasencia.

O estudo das Hbs dos indivíduos VII-1 a VII-23, por HPLC de troca catiónica, revelou a ausência de picos anormais. O uso da técnica de eletroforese em acetato de celulose revelou a presença de uma banda desconhecida, que corresponde à Hb Plasencia (Figura 20). Verificou-se que a Hb Plasencia migra mais lentamente no gel que a Hb A.

O estudo das cadeias globínicas por HPLC de fase reversa e por AUT-PAGE (Figuras 21 e 22) revelou a ausência de frações correspondentes às cadeias α mutadas. Adicionalmente, verificou-se que o rácio das cadeias globínicas α/β é de 1.25, não se verificando um desequilíbrio significativo nos níveis das cadeias α e β sintetizadas.

Os estudos *in silico* para a mutação revelaram resultados concordantes. O SIFT e o Polyphen-2 preveem que a mutação afete a função da Hb.

De acordo com a informação inserida na base de dados HbVar, a Hb Plasencia foi identificada inicialmente em famílias de origem espanhola e portuguesa, surgindo associada a microcitose e hipocromia. Pelos resultados acima indicados verifica-se que esta mutação é uma causa de fenótipo α -talassémico frequente na população de origem portuguesa. A substituição CTG>CGG no codão 125 ocorre na hélice H8, na zona interna da Hb. A substituição de uma leucina por uma arginina resulta na substituição de um aminoácido alifático e apolar, por um aminoácido carregado positivamente a pH 7 (Figura 47). De acordo com estudos anteriores a Hb Plasencia é uma variante talassémica e muito instável.

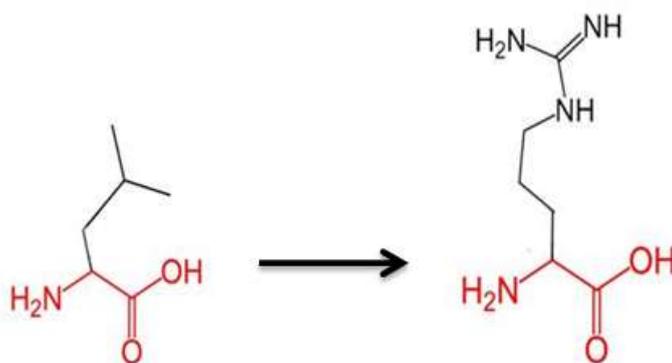


Figura 47: Substituição de uma leucina por uma arginina. A vermelho encontra-se ilustrada a constituição que se mantém em todos os aminoácidos e a vermelho o grupo variável (grupo R).

As hélices H encontram-se principalmente associadas aos contatos $\alpha 1\beta 1$ e à ligação das AHSP às cadeias α . O contato $\alpha 1\beta 1$ permite a ligação das moléculas de O₂ à Hb de forma estável. Por outro lado a interação da proteína AHSP com as cadeias α -globínicas contribui para a estabilidade, estrutura e montagem das cadeias α (Favero *et al.*, 2011, Szolajska *et al.*, 2011). A ocorrência de mutações nas cadeias H, que afetem o contato $\alpha 1\beta 1$, origina muitas vezes variantes instáveis e talassémicas (Wajcman *et al.*, 2008).

No caso da Hb Plasencia verifica-se que esta mutação origina cadeias com a incapacidade de forma dímeros estáveis e conseqüentemente não se verifica a formação de tetrâmeros estáveis (Martin *et al.*, 2005, Garçon *et al.*, 2010). As cadeias α mutadas livres sofrem proteólise.

Tal como previsto pelos *softwares* SIFT e Polyphen-2 a mutação afeta a função da Hb.

No codão 125 encontram-se descritas outras três mutações, Hb West-Einde, Hb Quong Sze e Hb Quong Sze II, sendo estas últimas bastante instáveis (Tabela 13).

Tabela 13: Lista das variantes α descritas que ocorrem no codão 125.

Nome da Hb	Mutação	Zona da proteína	Fenótipo
Hb West-Einde	$[\alpha 125(\text{H8})\text{Leu} \rightarrow \text{Gln}(\text{CTG} > \text{CAG}) (\alpha 2)]$	Interna	-
Hb Quong Sze	$[\alpha 125(\text{H8})\text{Leu} \rightarrow \text{Pro}(\text{CTG} > \text{CCG}) (\alpha 2)]$	Interna	Muito I
Hb Quong Sze II	$[\alpha 125(\text{H8})\text{Leu} \rightarrow \text{Pro}(\text{CTG} > \text{CCG}) (\alpha 1)]$	Interna	Muito I

1.8 CASO CLÍNICO 8

Indivíduo VIII

A sequenciação mostrou a presença da seguinte mutação $\alpha 141(\text{HC3})\text{Arg}\rightarrow\text{Gly}(\underline{\text{CGT}}>\underline{\text{GGT}})$ ($\alpha 2$), em heterozigotia. Esta pode ocorrer também no gene $\alpha 1$ e encontra-se descrita na literatura como Hb J-Camaguey.

Os estudos *in silico* para a mutação revelaram resultados concordantes. O SIFT e o Polyphen-2 preveem que a mutação afete a função da Hb.

De acordo com a informação inserida na base de dados HbVar, a Hb J-Camaguey foi inicialmente identificada em famílias de origem espanhola, chinesa e australiana. Os indivíduos portadores da mutação ($\alpha^T\alpha/\alpha\alpha$ ou $\alpha\alpha^T/\alpha\alpha$) apresentam os parâmetros hematológicos normais. Esta corresponde a aproximadamente 18-20% de Hb total do indivíduo.

A substituição $\underline{\text{CGT}}>\underline{\text{GGT}}$ no codão 141 ocorre na dobra HC3, no terminal carboxílico da cadeia globínica. A substituição de uma arginina por uma glicina resulta na substituição de um aminoácido carregado positivamente a pH 7, por um aminoácido alifático e apolar (Figura 48). O resíduo Arg141 é responsável pela formação de pontes salinas com resíduos vizinhos, que vão estabilizar a estrutura T da Hb (Shimasaki, 1985). De acordo com estudos anteriores verificou-se que a Hb J-Camaguey é uma variante ligeiramente instável e apresenta alta afinidade para o O_2 , apresentando desta forma a função afetada, como era previsto pelos *softwares* SIFT e Polyphen-2.

Adicionalmente, o resíduo Arg141 participa diretamente no contato $\alpha 1\beta 2$. A substituição de aminoácidos neste contato afeta a função da Hb, pois este participa diretamente na ligação das moléculas de O_2 à Hb, de forma cooperativa. Desta forma, este controla também a afinidade da Hb para o O_2 (Shikama *et al.*, 2003).

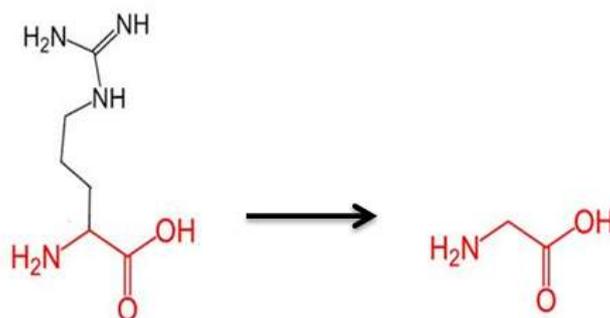


Figura 48: Substituição de uma arginina por uma glicina. A vermelho encontra-se ilustrada a constituição que se mantém em todos os aminoácidos e a vermelho o grupo variável (grupo R).

A mutação que caracteriza a Hb J-Camaguey vai interferir na formação de pontes entre os dímeros e de pontes salinas entre resíduos vizinhos, destabilizando a estrutura quaternária tensa da Hb. Desta forma verifica-se uma maior estabilização da forma relaxada e desta forma ocorre um aumento da afinidade da variante para o O_2 (Shimasaki, 1985, Brennan *et al.*, 1991).

No codão 141 encontram-se descritas outras quatro variantes de Hb, Hb J-Cubujuqui, Hb Nunobiki, Hb Suresnes e Hb Singapore (Tabela 14). Todas elas, excluindo a Hb Surennes apresentam fenótipo de alta afinidade.

Tabela 14: Lista das variantes α descritas que ocorrem no codão 141.

Nome da Hb	Mutação	Zona da proteína	Fenótipo
Hb J-Cubujuqui	[α 141(HC3)Arg→Ser(CGT>AGT) (α 2 ou α 1)]	Contato α 1 β 2	↑O
Hb Nunobiki	[α 141(HC3)Arg→Cys(CGT>TGT) (α 2 ou α 1)]	Contato α 1 β 2	↑O
Hb Suresnes	[α 141(HC3)Arg→Hys(CGT>CAT) (α 2 ou α 1)]	Contato α 1 β 2	-
Hb Singapore	[α 141(HC3)Arg→Pro(CGT>CCT) (α 2 ou α 1)]	Contato α 1 β 2	↑O

2. VARIANTES NÃO DESCRITAS

2.1. CASO CLÍNICO 9

Indivíduo IX

O estudo das Hbs do indivíduo IX, por eletroforese em acetato de celulose e IEF (Figuras 25 e 26), revelou a presença de uma banda correspondente a uma variante de Hb.

O estudo das cadeias globínicas por HPLC de fase reversa e por AUT-PAGE (Figuras 27 e 28) revelou a ausência de frações correspondentes a alguma variante de Hb. Verificou-se que o rácio α/β cadeias globínicas é de 1.16, não se verificando qualquer desequilíbrio nos níveis das cadeias α e β sintetizadas.

A sequenciação mostrou a presença da seguinte mutação $\alpha 40(\text{C5})(\text{Lys} \rightarrow \text{Asn})(\text{AAG} > \text{AAT})$ ($\alpha 1$), em heterozigotia (Figura 29). Esta não se encontra descrita na literatura, desta forma será denominada por Hb HUC.

Os estudos *in silico* para a mutação revelaram resultados concordantes. O SIFT e o Polyphen-2 preveem que a mutação afete a função da Hb.

A substituição anteriormente referida ocorre no codão 40, na hélice C5, no contato $\alpha 1\beta 2$. A substituição de uma lisina por uma asparagina resulta na substituição de um aminoácido polar e carregado positivamente a pH 7, por um aminoácido polar e não carregado (Figura 49). Em geral, as hélices C têm sido associadas fortemente aos contatos $\alpha 1\beta 2$ e $\alpha 1\beta 1$ e à ligação ao grupo heme. Os contatos $\alpha 1\beta 2$ e $\alpha 1\beta 1$ contribuem para a ligação das moléculas de O_2 à Hb de forma cooperativa e estável, repetidamente

(Shikama *et al.*, 2003). A ocorrência de mutações ao nível das cadeias C, principalmente no contato $\alpha 1\beta 1$ originam muitas vezes variantes instáveis e variantes talassémicas (Wajcman *et al.*, 2008). Mutações que afetem o contato $\alpha 1\beta 2$ estão associadas muitas vezes a diferenças de afinidade pelo O_2 . Desta forma é provável que a substituição anteriormente referida afete a função da Hb, tal como é previsto pelos *softwares* SIFT e PolyPhen-2.

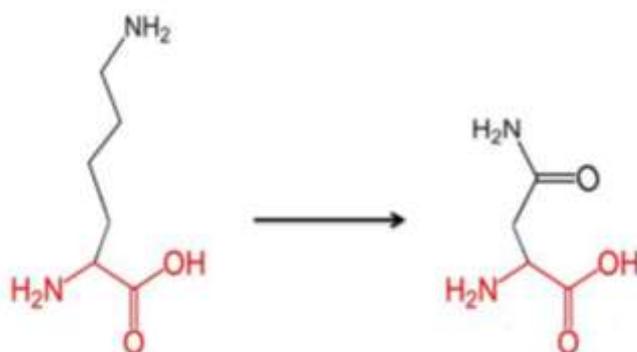


Figura 49: Substituição de uma lisina por uma asparagina. A vermelho encontra-se ilustrada a constituição que se mantém em todos os aminoácidos e a vermelho o grupo variável (grupo R).

De acordo com os estudos funcionais realizados verificou-se que a Hb HUC é uma variante de Hb estável e na presença de 2,3-DPG apresenta uma ligeira alta afinidade quando comparado com o controlo normal (Figura 32). Tal fenótipo pode ser justificado devido à mutação ocorrer no contato $\alpha 1\beta 2$ que é bastante importante para manter a afinidade da Hb. Desta forma a ligação de moléculas de O_2 à Hb está facilitada.

Pelas simulações de dinâmica molecular verifica-se que a presença da mutação leva à perda de uma ponte de hidrogénio que era anteriormente estabelecida com a cadeia β . Desta forma a variante torna-se mais flexível facilitando a ligação de O_2 (Figura 33).

No codão 40 foi reportada a ocorrência de outras seis mutações estruturais (Tabela 15).

Na maioria dos casos, tal como se verificou para a variante Hb HUC as variantes de Hb que ocorrem no codão 40 apresentam alta afinidade para o O₂.

Tabela 15: Lista das variantes α descritas que ocorrem no codão 40.

Nome da Hb	Mutação	Zona da proteína	Fenótipo
Hb Kariya	[α 40(C5)Lys→Glu(AAG>GAG) (α 2 ou α 1)]	Contato α 1 β 1	Levemente I, \uparrow O
Hb Linwood	[α 40(C5)Lys→Gln(AAG>CAG) (α 2)]	Contato α 1 β 1	\uparrow O
Hb Kanagawa	[α 40(C5)Lys→Met(AAG>ATG) (α 2)]	Contato α 1 β 2	\uparrow O
Hb Villiers le Bel	[α 40(C5)Lys→Asn(AAG>AAC) (α 2)]	Contato α 1 β 2	-
Hb Pisa	[α 40(C5)Lys→Thr(AAG>ACG) (α 1)]	Contato α 1 β 2	-
Hb Saratoga Springs	[α 40(C5)Lys→Asn(AAG>AAC) (α 1)]	Contato α 1 β 2	\uparrow O

2.2 CASO CLÍNICO 10

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

O estudo das Hbs dos indivíduos X, XI e XII, por HPLC de troca catiónica, eletroforese em acetato de celulose e IEF, revelou a ausência de uma banda correspondente a uma variante de Hb (Tabela 9, Figuras 35 e 26).

O estudo das cadeias globínicas por HPLC de fase reversa e por AUT-PAGE (Figuras 37 e 38) revelou uma vez mais a ausência de frações correspondentes a alguma variante de Hb. Verificou-se que o rácio α/β cadeias globínicas é de 1.17, não se verificando qualquer desequilíbrio nos níveis das cadeias α e β sintetizadas.

Os indivíduos I-1, I-2, II-1, III-1, III-2 e III-3 apresentaram a seguinte mutação $\alpha 104(G11)(Cys \rightarrow Arg)(\underline{TGC} > \underline{CGC})$, no gene $\alpha 2$ (Figura 39). Os indivíduos I-1, I-2, II-1 e III-2 mostraram ter a mutação em heterozigotia, apresentando o genótipo $\alpha^T\alpha/\alpha\alpha$. Os restantes indivíduos III-1 e III-3 mostraram ter a mesma mutação aparentemente em homozigotia devido à associação de $-\alpha^{3.7}$ em *trans*. Desta forma, estes apresentaram o genótipo $\alpha^T\alpha/-\alpha^{3.7}$. A Hb com a mutação $\alpha 104(G11)(Cys \rightarrow Arg)(\underline{TGC} > \underline{CGC})$ ($\alpha 2$) fica conhecida por Hb Iberia, tendo sido recentemente descrita pelo grupo do laboratório.

O rácio do mRNA α/β para os indivíduos III-1, III-2 e III-3 foi repetivamente 0.37, 1.015 e 0.38. Anteriormente, no laboratório verificou-se que indivíduos normais apresentam um rácio compreendido entre 0.93 e 1.28 (estudo realizado com 27 indivíduos). Desta forma, para os indivíduos III-1 e III-3, com genótipo $\alpha^T\alpha/-\alpha^{3.7}$, verifica-se que os rácios diminuídos resultam da presença da deleção $\alpha^{3.7}$ que causa $\alpha-$

talassémia. O indivíduo III-3, com genótipo $\alpha^T\alpha/\alpha\alpha$ apresenta um rácio normal quando comparado com os valores de referência. O rácio das cadeias globínicas α/β para o indivíduo II-1 foi de 1.17, não se verificando qualquer desequilíbrio nos níveis das cadeias α e β sintetizadas. Pelos dois tipos de rácios calculados verifica-se que a mutação não afeta os processos de transcrição e tradução para as cadeias α -globínicas.

Os estudos *in silico* para a mutação revelaram resultados concordantes. O SIFT e o Polyphen-2 preveem que a mutação afeta a função da Hb.

A substituição anteriormente referida ocorre no codão 104, na hélice G11, no contato $\alpha 1\beta 1$. A substituição de uma cisteína por uma arginina resulta na substituição de um aminoácido polar e não carregado, por um aminoácido polar e carregado positivamente a pH 7 (Figura 50).

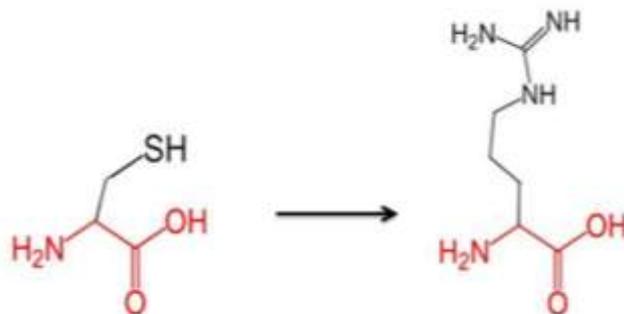


Figura 50: Substituição de uma cisteína por uma arginina. A vermelho encontra-se ilustrada a constituição que se mantém em todos os aminoácidos e a vermelho o grupo variável (grupo R).

A cisteína no codão 104 participa na formação dos contatos $\alpha 1\beta 1$ e contribui para a estabilidade dos mesmos. Por outro lado é importante para a formação dos dímeros e dos tetrâmeros de Hb. Esta interage à distância com os aminoácidos Ala28, Arg31, Met32, Phe36 e Leu109 na mesma cadeia α e interage com os aminoácidos Gln127 e

Gln131 na cadeia β parceira (Morlé *et al.*, 1995, Harteveld *et al.*, 2005, Roy *et al.*, 2009).

Em geral, as hélices G têm sido associadas fortemente aos contatos $\alpha 1\beta 2$ e $\alpha 1\beta 1$ e à interação com a proteína AHSP. Os contatos $\alpha 1\beta 2$ e $\alpha 1\beta 1$ contribuem para a ligação das moléculas de O_2 à Hb de forma cooperativa e estável, repetivamente (Shikama *et al.*, 2003). Por outro lado, a AHSP tem mostrado ser importante durante o *folding* e *assembling* das cadeias α e em manter a estabilidade das mesmas (Favero *et al.*, 2011, Szolajska *et al.*, 2011). A ocorrência de mutações ao nível das cadeias G, principalmente no contato $\alpha 1\beta 1$ originam muitas vezes variantes instáveis e variantes talassémicas (Wajcman *et al.*, 2008).

No codão 104 das cadeias α -globínicas estão descritas outras duas variantes, Hb Sallanches e Hb Oegstgeest (Tabela 16), sendo ambas instáveis e variantes α -talassémicas (α^+) (Wajcman *et al.*, 2008, Vasseur *et al.*, 2009). A interação destas com a AHSP ocorre normalmente, sem alterações associadas. É possível encontrar os dois tipos de Hbs nos eritrócitos embora a Hb Oegstgeest esteja em quantidades reduzidas (Vasseur *et al.*, 2009).

Tabela 16: Lista das variantes α descritas que ocorrem no codão 104.

Nome da Hb	Mutação	Zona da proteína	Fenótipo
Hb Sallanches	[$\alpha 104(G11)Cys \rightarrow Tyr(TGC > TAC)$ ($\alpha 2$)]	Contato $\alpha 1\beta 1$	I, α^+
Hb Oegstgeest	[$\alpha 104(G11)Cys \rightarrow Ser(TGC > AGC)$ ($\alpha 1$)]	Contato $\alpha 1\beta 1$	Muito I, α^+

De acordo com os rácios obtidos anteriormente os processos de transcri o e tradu o ocorrem em níveis corretos.   possível que os tetrâmeros mutados sejam muito instáveis e desta forma precipitem. Tal suposi o contraria o resultado obtido pelo teste de estabilidade, que mostrou que a Hb Ibéria seria uma variante estável. A presença de Hb Ibéria nos hemolisados, não purificados, em níveis bastante reduzidos pode justificar o resultado obtido para o estudo de estabilidade e a sua não detec o pelo estudo das Hbs.

Desta forma concluísse que a muta o recentemente descrita pelo grupo do laboratório e conhecida por Hb Ibéria   uma variante muito instável e α -talass mica que quando em heterozigotia resulta em parâmetros hematológicos alterados, ou seja, valores de eritrócitos aumentados e valores de VGM e HGM diminuídos. A substitui o da cisteína por uma arginina resulta na destabiliza o do contato $\alpha 1\beta 1$, que posteriormente contribuir  de forma negativa para a estabilidade dos tetrâmeros.

