

III. Material e métodos

O estudo das hemoglobinopatias é um processo longo e dispendioso. Desta forma, em 1975 no Comité Internacional para Uniformização da Hematologia identificaram-se os estudos prioritários para a avaliação destas doenças. Os estudos recomendados numa análise inicial são, quantificação dos parâmetros hematológicos (hemograma), electroforese a pH 9.2, testes de solubilidade e de falcização e quantificação dos níveis de Hb A₂ e Hb F. A deteção da possível presença de uma variante de Hb deve ser comprovada pela realização de estudos adicionais. Estes devem englobar, electroforese a pH 6.0 – 6.2, separação das cadeias globínicas, focagem isoelétrica (IEF), sequenciação e testes funcionais (testes de estabilidade e afinidade para o O₂) (Clarke *et al.*, 2000). A realização dos testes anteriormente referidos depende da disponibilidade das técnicas e de pessoas habilitadas nos laboratórios.

Neste trabalho, o estudo das amostras dos indivíduos englobou as seguintes etapas, **1.1)** análise dos parâmetros hematológicos, **1.2)** preparação das amostras, **1.3)** estudo das Hbs, **1.4)** estudo das cadeias globínicas, **1.5)** estudos moleculares, **1.6)** estudos funcionais e **1.7)** estudos *in silico*.

As amostras de sangue dos indivíduos estudados foram colhidas para tubos com ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) ou heparina.

1.1. ANÁLISE DOS PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS

Os parâmetros hematológicos (Hb, eritrócitos, VGM, HGM e reticulócitos) dos indivíduos estudados foram obtidos pelo analisador CELL-DYN Sapphire (Abbott Diagnostics, Illinois, USA).

As talassémias são normalmente caracterizadas pela presença de anemia hipocrômica e microcítica (valores de Hb, HGM e VGM inferiores aos valores de referência) e eritrocitose (valores de eritrócitos aumentados). A presença de variantes de Hb em heterozigotia normalmente não causa alterações nos valores hematológicos. A sua presença em homozigotia normalmente altera os valores hematológicos.

1.2. PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

1.2.1. EXTRAÇÃO DE ADN

O ADN genómico foi extraído de leucócitos das amostras de sangue pelo uso do kit QIAamp® DNA Blood Mini (QIAGEN, Hilden, Germany). O protocolo de extração

englobou o uso de colunas (QIAamp Mini Spin columns) e a realização de quatro etapas principais, lise com QIAGEN protease, ligação do ADN à membrana de sílica (QIAamp silica membrane), lavagem para a remoção de contaminantes residuais e eluição do ADN purificado.

1.2.2. EXTRAÇÃO DE ARN

Previamente ao protocolo de extração de ARN realizou-se a desleucocitação das amostras de sangue.

Para a desleucocitação utilizou-se 1 mL de amostra de sangue. Este volume foi filtrado numa mistura de celulosas microcristalinas e de seguida lavado com tampão salino (NaCl 0.9%). Após a adição do tampão a solução foi sujeita a centrifugação (2500 rpm, 5 min). A etapa de lavagem e centrifugação foi repetida por três vezes. Ao sedimento final obtido adicionou-se 10 mL de tampão de lise (NH_4Cl 155 mM, KHCO_3 10 mM e EDTA 0.1 mM) e realizou-se uma incubação de 15 min a 4°C. Após a incubação, centrifugou-se (3000 rpm, 3 min) e repetiu-se a etapa de adição de tampão de lise. O pellet obtido foi lavado pela adição de 3 mL de PBS, seguindo-se uma nova centrifugação (3000 rpm, 3 min). Na etapa final adicionou-se ao pellet obtido 500 μL de TRIzol.

O protocolo de extração de ARN englobou três etapas principais, separação de fases, precipitação do ARN e lavagem do ARN.

Aos lisados anteriormente preparados adicionou-se 150 μL de clorofórmio e centrifugou-se (3000 rpm, 8 min). Após a centrifugação, o produto resultante apresentava-se dividido em três fases distintas. Pipetou-se a fase superior, ou seja a fase

aquosa (fase onde se encontrava o ARN), para um novo eppendorf e adicionou-se 300 μL de isopropanol. De seguida realizou-se uma incubação de 20 min a -20°C . Após a incubação centrifugou-se (10600 rpm, 8 min) e ao sedimento obtido adicionou-se 600 μL de etanol 75%. Seguiu-se uma nova centrifugação (8400 rpm, 5 min). O sobrenadante foi novamente descartado e deixou-se secar o sedimento de ARN à temperatura ambiente. Após a secagem do sedimento adicionou-se 20 μL de água destilada estéril. A concentração e a pureza das amostras de ARN foram obtidas pela medição das absorvâncias a 260 nm e a 280 nm no NanoDrop 1000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA).

1.2.3. PREPARAÇÃO DOS HEMOLISADOS

As amostras foram lavadas com tampão salino (NaCl 0.9%) e centrifugadas (3000 rpm, 4°C , 10 min) por três vezes consecutivas. Aos sedimentos finais obtidos adicionou-se um volume equivalente de água destilada refrigerada e centrifugou-se (16000 rpm, 4°C , 30 min). Na última etapa foi guardado o sobrenadante obtido e descartado o pellet.

1.3 ESTUDO DAS HBS

O estudo das Hbs foi realizado pelas seguintes técnicas, Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC) de troca catiónica, eletroforese em acetato de celulose e IEF.

Um indivíduo saudável com menos de 6 meses de idade deverá apresentar, em termos de Hb total, aproximadamente 20% de Hb A e 80% de Hb F. Um indivíduo saudável com mais de 6 meses deverá apresentar um cromatograma com aproximadamente 97% de Hb A, 2 a 3.5% de Hb A₂ e valor inferior a 1% para Hb F.

1.3.1.HPLC DE TROCA CATIONICA

Os níveis de Hb A₂ e Hb F e a presença ou ausência de variantes de Hb foram analisados por HPLC de troca catiónica no sistema VARIANT II™ e β-Thalassemia Short Program (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA).

1.3.2.ELETROFORESE EM ACETATO DE CELULOSE

Inicialmente preparou-se hemolisados, misturando-se uma gota de sangue com 500 µL de água. Adicionou-se 10 µL do produto resultante a uma tira de eletroforese (anteriormente equilibrada em tampão TBE (Tris-borato EDTA 0.08 M a pH 8.4)), com o auxílio de um aplicador. A electroforese realizou-se a 330 V durante aproximadamente 25 min. A tira de electroforese foi corada com a solução Red Ponceau S durante 5 min e posteriormente descolorada com uma solução de ácido acético 5%.

1.3.3.IEF

Os hemolisados foram analisados em géis de poliacrilamida 5% de camada fina (Pharmalyte pH range 6.7-7.7 Amersham Pharmacia Biotec AB).

O gel para a IEF foi preparado pela adição dos seguintes reagentes, solução de acrilamida 30% BisAcrilamida 0,93% (5.85 mL), *ampholine* para um range de pH 6.7 – 7.7 (2.352 mL), água destilada (26.85 mL), persulfato de amónio 40% (48.65 µL) e Temed (54.6 µL). A pré-focagem realizou-se a 400 V e a corrida, na presença das amostras, foi a 900 V. Depois o gel foi corado (etanol 50%, ácido acético 5% e bromofenol 0.1%) durante 20 min e descolorado (etanol 30% e ácido acético 6%).

1.4. ESTUDO DAS CADEIAS GLOBÍNICAS

O estudo das cadeias globínicas realizou-se pelas seguintes técnicas, HPLC de fase reversa e electroforese em ureia 8M e Triton X-100 (AUT-PAGE).

Um indivíduo saudável com menos de 6 meses de idade deverá apresentar principalmente cadeias α e γ -globínicas e em menor quantidade cadeias β . Um indivíduo saudável com mais de 6 meses de idade deverá apresentar principalmente cadeias α e β -globínicas.

1.4.1. HPLC DE FASE REVERSA

A separação das cadeias globínicas, por HPLC de fase reversa, realizou-se no System Gold (Beckman), com uma coluna LiChrospher RP8, 5 μ m beads, 250 x 4 mm (Bio-Rad). Utilizaram-se duas fases móveis ($\text{CH}_3\text{CN}/\text{CH}_3\text{OH}:\text{NaCl}$ 0.155 M a pH 2.7), A e B, que se utilizaram nas proporções 50:20:30 e 25:40:35 respetivamente. Foi aplicado um gradiente linear de solvente B (90% \rightarrow 20%) durante 90 min, a uma taxa de fluxo de 0.7 mL/min. Os tempos de retenção das cadeias globínicas presentes nas amostras foram analisados pela comparação de tempos de retenção das cadeias conhecidas.

1.4.2. AUT-PAGE

O gel foi preparado pela adição dos seguintes reagentes, solução de ureia 8M (em 6.85 mL de água), solução de Acrilamida 50% Bisacrilamida 0.32% (2.35 mL), ácido acético (0.457 mL), Triton X-100 (0.183 mL), Riboflavina (0.1217 mL) e Temed (0.0365 mL). Paralelamente, foram preparados hemolisados com uma concentração 1 mg/mL e

adicionou-se igual volume de tampão desnaturante (para 1 mL de tampão misturou-se ureia 8M (em 0.8 mL de água), ácido acético (0.1 mL) e β -mercaptoetanol (0.1 mL)) e aguardou-se 30 min.

A corrida das amostras realizou-se a 10 mA. De seguida o gel foi corado (Comassie blue 0.25%, ácido acético 7% e metanol 30%) durante 20 min e depois descolorado (ácido acético 7% e metanol 30%).

1.5. ESTUDOS MOLECULARES

Os estudos moleculares englobaram as seguintes técnicas, Gap-PCR multiplex, Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA), Sequenciação e Real-time PCR.

1.5.1 Gap-PCR multiplex

Por Gap-PCR multiplex foi possível estudar a presença ou ausência das deleções mais frequentes em Portugal, $-\alpha^{3.7}$ e $-\alpha^{4.2}$.

Para cada amostra de ADN (0.5 μ L) preparou-se uma solução contendo os seguintes reagentes, água destilada estéril (11.75 μ L), tampão PCR 10X (2.5 μ L), solução Q 5X (5 μ L), dNTP's 10 mM (0.5 μ L), primer $\alpha 2/3.7$ -F a 100 ng/ μ L (0.5 μ L) (5'-CCCCTCGCCAAGTCCACCC-3'), primer 3.7/20.5-R a 100 ng/ μ L (0.5 μ L) (5'-AAAGCACTCTAGGGTCCAGCG-3'), primer $\alpha 2/3.7$ -F a 100 ng/ μ L (0.5 μ L) (5'-CCCCTCGCCAAGTCCACCC-3'), primer $\alpha 2$ -R a 100 ng/ μ L (0.5 μ L) (5'-AGACCAGGAAGGGCCGGTG-3'), primer 4.2-F a 100ng/ μ L (1.25 μ L) (5'-

GGTTTACCCATGTGGTGCCTC-3'), primer 4.2-R a 100ng/μL (1.25 μL) (5'-CCCGTTGGATCTTCTCATTTC-3') e HotStarTaq® DNA polimerase a 5 U/μL (0.25 μL). De seguida realizou-se a reação de PCR, no termociclador Biometra ® TPersonal Thermal Cycler (AlphaGen, Iowa, USA) de acordo com as seguintes condições: 95°C (5 min), 30 ciclos de 97°C (45 s), 60°C (75 s) e 72°C (150 s) e por fim uma última etapa a 72°C (5 min).

Os produtos amplificados foram visualizados num gel de agarose 2% corado com brometo de etídio.

1.5.2 MLPA

A deteção de grandes deleções no agrupamento de genes que regula a síntese das cadeias α-globínicas foi realizada pela técnica de MLPA utilizando o kit SALSA MLPA P102-B1 HBB (MCR-Holland, Amsterdam, The Netherlands).

Inicialmente, colocou-se 5 μL de amostra de ADN (concentração de 100 ng/μL) no termociclador a 98°C durante 5 min. De seguida adicionou-se 1.5 μL de SALSA probemix e 1.5 μL de tampão MLPA e seleccionaram-se as seguintes condições 95°C (1 min), e 60°C (16 h). Adicionou-se 32 μL de solução Ligase-65 mix e as amostras foram sujeitas às seguintes condições 54°C (15 min) e 98°C (5 min). Depois adicionou-se 10 μL de Polymerase mix e iniciou-se a reação de PCR englobando as seguintes condições, 35 ciclos de 35°C (30 s), 60°C (30 s) e 72°C (60 s), e no final uma etapa a 72°C (20 min). Os produtos amplificados foram desnaturados a 80°C durante 2 min e por fim colocaram-se no leitor de sequências.

1.5.3 SEQUENCIAÇÃO

Para se realizar a amplificação dos genes HBA2 e HBA1 prepararam-se duas soluções respetivamente. Para a sequenciação do gene HBA2, a solução preparada continha água destilada estéril (28 μL), Tampão PCR 10X (5 μL), solução Q 5X (10 μL), dNTP's 10 Mm (0.8 μL), Primer α comum-F 20 μM (2 μL) (5'-GGTGCACGAGCCGACAGCGC-3'), Primer α 2-R 20 μM (2 μL) (5'-GCAGGCCTGGCACCTCTCAG-3'), Taq DNA Polimerase Platinum® 5 U/ μL (0.2 μL) e ADN (2 μL). Para a sequenciação do gene HBA1, a solução preparada continha, água destilada estéril (28 μL), Tampão PCR 10X (5 μL), solução Q 5X (10 μL), dNTP's 10 mM (0.8 μL), Primer α comum-F 20 μM (2 μL) (5'-GGTGCACGAGCCGACAGCGC-3'), Primer α 1-R 20 μM (2 μL) (5'-CTGGACTTCGCGGTGGCT-3'), Taq DNA Polimerase Platinum® 5 U/ μL (0.2 μL) e ADN (2 μL). Realizou-se uma reação de PCR nas seguintes condições, 95°C (3 min), 34 ciclos de 95°C (1 min), 65°C (1 min) e 72°C (90 s) e por fim uma última etapa a 72°C por 5 min. Os produtos amplificados foram observados num gel de agarose a 2% corado com SyBrSAFE DNA.

Os produtos de PCR que não apresentaram bandas inespecíficas foram purificados com a enzima ExoSAP-IT® (1.5 μL de enzima mais 6 μL de produto amplificado) e colocadas no termociclador sendo sujeitas a 37°C (15 min) e 80°C (15 min).

Os produtos purificados foram de seguida sequenciados num Hitachi 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) usando o BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA). Neste caso preparou-se para cada amostra soluções com água (6.5 μL), BigDye (1 μL), um primer (0.5 μL) e produto amplificado (2 μL). Os primers usados nesta etapa foram Primer

EXT II α 20 μ M (5'- ATGTTCTGTCCTTCCCCAC-3') e primer EXT III α 20 μ M (5'-AGTTCCTGGCTTCTGTGAGC-3'), Primer α 2-A R 20 μ M (5'-TTATTCAAAGACCAGGAAGGGCCG-3') e Primer α 1-B R 20 μ M (5'-CGCCCACTCAGACTTTATTCAAAG-3').

1.5.4 REAL-TIME PCR

Previamente à reação de Real-time PCR realizou-se a transcrição reversa das amostras de ARN previamente produzidas, com o kit High Capacity cDNA Reverse Transcriptase (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Desta forma inicialmente colocou-se 20 μ L de ARN (com uma concentração de 1 mg/mL) a linearizar no termociclador, a 65°C (10 min) e 37°C (10 min). Preparou-se uma mix contendo, tampão RT (5.0 μ L), random primers (5.0 μ L), dNTPs (2 μ L), multiScribeRT (2.5 μ L), inibidor da RNase (1 μ L), água (9.5 μ L) e 25 μ L de ARN linearizado. As soluções foram novamente colocadas no termociclador e sujeitas às seguintes condições, 25°C (2 min), 2 ciclos de 37°C (60 min) e 85°C (5min).

O real-time realizou-se para a quantificação do mRNA das cadeias α e β -globínicas. Desta forma preparou-se uma solução com água destilada estéril (6.46 μ L), primer α -Forward 100nM (0.2 μ L) (5'- CACGCTGGCGAGTATGGT-3'), Primer α -Reverse 100nM (0.2 μ L) (5' – ACCAAGACCTACTTCCCGC-3'), primer β -Forward 100nM (0.2 μ L) (5'- GGTGAACGTGGATGAAGTTGGT-3'), Primer β -Reverse 100nM (0.2 μ L) (5'- TCTACCCTTGGACCCAGAGG-3'), sonda α -VIC 60 nM (0.12 μ L) (5'- CCTGGAGAGGATGTTCC-3'), sonda β -FAM-TAMRA 60 nM (0.12 μ L) (5'-

CTGGGCAGGCTGCTGGT-3') e TaqManTM Universal PCR MASTER MIX (12.5 µL) (Applied Biosystem, Branchburg, NJ, USA). A reação de PCR realizou-se no aparelho 7300 Real Time PCR Systems (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), de acordo com as seguintes condições, 50°C (2min), 95°C (10min), e 40 ciclos de 95°C (15 s) e 55°C (1min). Como gene controlo utilizou-se o GAPDH. A eficiência das reações foi determinada pela realização de curvas de calibração para os vários cDNAs e o rácio α/β mRNA foi obtido pelo *software* REST 2009.

1.6. ESTUDOS FUNCIONAIS

Para se estudar as amostras a nível funcional realizaram-se estudos de instabilidade (útil para a deteção de variantes instáveis) e estudos de afinidade de oxigénio (útil para a deteção de variantes com afinidade alterada).

1.6.1. TESTE DE INSTABILIDADE

Incubou-se 0.2 mL de hemolisado com 2 mL de isopropanol a uma temperatura de 37°C, e aos 30 min analisou-se a solução. Se esta se encontrar límpida o teste é negativo. Se esta apresentar precipitação então o teste é positivo.

1.6.2. TESTES DE AFINIDADE DE OXIGÉNIO

As curvas de equilíbrio de oxigénio foram obtidas a 37°C, no range de pH 6.2-7.6, pelo método tonométrico.

Os fosfatos orgânicos foram inicialmente removidos dos hemolisados usando uma coluna Sephadex G-25 equilibrada com o tampão 100mM Tris/HCl pH 8 contendo

100mM NaCl. Os ensaios funcionais foram realizados com tampões 100mM Tris ou BisTris/HCl, contendo 100mM NaCl, na presença e na ausência de 2,3-DPG 5mM, a diferentes pHs, a 37°C.

1.7. ESTUDOS *IN SILICO*

Para a realização dos estudos *in silico*, utilizaram-se os seguintes *softwares*, PolyPhen-2, SIFT e Project HOPE.

O PolyPhen-2 é uma ferramenta que prediz as possíveis consequências da substituição do aminoácido na estrutura e função nas proteínas humanas.

O SIFT prediz se a substituição afeta a função da proteína baseando-se no grau de conservação dos aminoácidos por alinhamentos de sequências homólogas.

O Project HOPE analisa os efeitos estruturais nas proteínas causados pela mutação.

1.8. SIMULAÇÕES DE DINÂMICA MOLECULAR

Inicialmente preparou-se o modelo Hb A a partir da estrutura raio-X a alta resolução 2DN2, a 1.25 Å, na forma deoxi-Hb. Depois realizou-se a protonação das histidinas. Solvatou-se o tetrâmero pela adição de 15035 moléculas de água numa caixa cúbica de dimensões 93.578 Å. Depois aqueceu-se o sistema por 1 ns de 10 a 300 K, aplicando restrições harmónicas nas coordenadas de todos os carbonos alfa. Durante esta parte usou-se o *software* NAMD versão 2.9. Com o *software* ACEMD aplicou-se 20 ns no conjunto NPT, seguido por 100 ns no conjunto NVT com apoios. Finalizou-se com 20 ns em NPT mas sem apoios, com uma caixa final de tamanho 82.4 Å. Foi aplicado o

campo de força amber99SB-ildn para a proteína, o campo de força amber para o HEME usando os parâmetros 'HARD' para a forma deoxi-Hb e TIP3P para a água. A partir da última estrutura realizou-se a simulação de dinâmica molecular durante 100 ns para a Hb A controlo e para a variante. A mutação foi obtida pela substituição da Lys40 por Asn40 na subunidade alfa1. As análises foram realizadas nos últimos 100 ns da simulação. O desvio de todo o tetrâmero desde a estrutura inicial não excedeu 1.8 Å.

