



UNIVERSIDADE DE  
COIMBRA

Valéria Alexandra Moreira Vaz Pinto

ESTUDO DE VARIANTES GENÉTICAS  
ASSOCIADAS AO AUMENTO DE HEMOGLOBINA  
FETAL NA POPULAÇÃO PORTUGUESA

Dissertação no âmbito do Mestrado em Evolução e Biologia Humanas orientada pela Professora Doutora Maria Manuela Prata Alvarez e pelo Doutor Licínio Manuel Mendes Manco, apresentada ao Departamento de Ciências da Vida, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra.

Setembro de 2019



Departamento de Ciências da Vida  
da Universidade de Coimbra

# ESTUDO DE VARIANTES GENÉTICAS ASSOCIADAS AO AUMENTO DE HEMOGLOBINA FETAL NA POPULAÇÃO PORTUGUESA

Valéria Alexandra Moreira Vaz Pinto

Dissertação no âmbito do Mestrado em Evolução e Biologia Humanas orientada pela Professora Doutora Maria Manuela Prata Alvarez e pelo Doutor Licínio Manuel Mendes Manco, apresentada ao Departamento de Ciências da Vida, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra.

Setembro de 2019



UNIVERSIDADE D  
COIMBRA



*“What we know is a drop,  
what we don't know is an ocean.”*

-Isaac Newton

*“Somewhere, something incredible  
is waiting to be know.”*

-Carl Sagan



## Agradecimentos

---

Aos meus orientadores, Doutora Manuela Alvarez e Doutor Licínio Manco, pela orientação, ajuda e paciência na elaboração desta dissertação;

Às minhas amigas, companheiras de licenciatura e mestrado: Joana Zuzarte pelas brincadeiras e momentos de descontração; Inês Cardoso pela tranquilidade; Sandra Carvalho pela paciência e assistência; Sónia Soares pelas palavras sábias;

Ao pessoal do sótão, Dulce Neves, Adriana Leite, Fernando Mestre, Francisco Maurício e Flávio Simões, pela companhia e a boa disposição.

À minha melhor amiga Sandra Bacquart pelo carinho, preocupação e apoio para a terminação desta dissertação;

À Catarina Baptista, Beatriz Marreiros e Patrícia Pirralho pela amizade e pelos cafés esporádicos que ajudaram a conservar a minha sanidade mental;

À Carolina Sá, Letícia Esteves, Milton Ferreira, André Silva, Carolina Caetano, Daniela Correia pelo companheirismo ao longo destes anos, por mostrarem o melhor lado de Coimbra;

Ao Óscar, por estar presente nos melhores e nos piores momentos, sei que não foi fácil. Pelo carinho, preocupação e ajuda prestada durante a realização deste percurso. Obrigada por seres o meu yang;

À minha avó paterna e aos meus avós maternos pelo carinho e valores transmitidos;

Aos meus pais pelo apoio e amor incondicional, sem eles nada disto seria possível;

À minha irmã, *my role model*, pela sua paciência e sabedoria. Por me mostrar que nunca devemos baixar a cabeça e devemos lutar contra as adversidades da vida, com um sorriso na cara;

Aos restantes familiares e amigos, que apesar de não estarem mencionados, também contribuíram de alguma maneira;

E por fim, ao Liam e a Flicka por serem os melhores companheiros que poderia ter, sem eles a vida não seria tão *fluffy*.





## Resumo

---

No organismo adulto e saudável, a hemoglobina fetal (HbF) representa menos de 1% da hemoglobina total, o que lhe confere pouca importância clínica ao nível da fisiologia normal. Porém, em certas hemoglobinopatias como anemia falciforme e  $\beta$ -talassemia, o aumento do nível de HbF poderá assumir grande importância por melhorar o quadro clínico dos doentes. A descoberta de que a regulação da HbF no organismo adulto está dependente de mecanismos genéticos abriu caminho para a investigação e identificação dos *loci* envolvidos no processo. Até ao presente, diversos estudos de associação, realizados em diferentes amostras populacionais, identificaram três *loci* principais envolvidos na regulação da produção de HbF: o polimorfismo rs7482144, situado na região promotora do gene *HBG2*, o gene *BCL11A* e a região intergénica *HMIP* (*HBS1L-MYB*). Entretanto, outras investigações identificaram novos polimorfismos que poderão estar envolvidos na regulação dos níveis de HbF, nomeadamente, LCR-5'HS4 (região controlo do locus beta-globina) rs16912979, *KLF1* rs79334031, *DCHS2* rs61746132, *RNF113B* rs16955011 e *ARHGAP18* rs11759328.

O objetivo principal da presente dissertação foi estudar diferentes *loci* candidatos numa amostra de portadores com  $\beta$ -talassemia *minor*, de nacionalidade portuguesa, e testar a sua associação com a variação dos níveis de HbF. Foram estudadas 66 amostras de indivíduos com  $\beta$ -talassemia *minor*, 30 do sexo masculino e 36 do sexo feminino, com idades entre 2 e 77 anos, diagnosticados no Serviço de Hematologia Clínica do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra (CHUC). Os indivíduos são saudáveis e assintomáticos, com valores de HbF entre 0,2% e 9% e níveis de HbA2 entre 3,4% e 6,8%. Para determinação do genótipo foram utilizadas as técnicas de i) *restriction fragment length polymorphism* (RFLP), recorrendo a enzimas de restrição após reação de polimerização em cadeia (PCR); ii) utilização de sondas TaqMan recorrendo a PCR em tempo real; e iii) sequenciação direta pelo método de Sanger.

A análise por regressão linear em modelo aditivo mostrou uma associação estatisticamente significativa com os níveis de HbF para os SNPs *BCL11A* rs1427407 ( $p = 0,03$ ), *HMIP* rs66650371 ( $p = 0,004$ ) e *XmnI-HBG2* rs7482144 ( $p = 0,004$ ) nos indivíduos portugueses com  $\beta$ -talassemia *minor*. Os SNPs *DCHS2* rs61746132, *RNF113B* rs16955011, *ARHGAP18* rs11759328, *KLF1* rs79334031 e LCR-5'HS4

rs16912979 não mostraram associação significativa com os níveis de HbF ( $p > 0,05$ ). O estudo do efeito cumulativo dos alelos *minor* dos SNPs *BCL11A* rs1427407, *HMIP* rs66650371 e *XmnI-HBG2* rs7482144 mostrou que existe um aumento na força de associação aos níveis de HbF com o aumento do número de alelos *minor*.

Em conclusão, os resultados obtidos neste estudo estão de acordo com o que tem sido descrito na literatura para os *loci* *XmnI-HBG2* rs7482144, *BCL11A* rs1427407 e *HMIP* rs66650371, associadas à regulação dos níveis de HbF em diferentes amostras populacionais com  $\beta$ -talassemia *minor*. Todavia, não foi possível identificar novas variantes genéticas envolvidas na regulação de HbF na amostra estudada. Considerando que a reativação da expressão do gene *HBG2*, com o consequente aumento dos níveis de HbF, traria benefícios clínicos importantes para os doentes com  $\beta$ -talassemia ou anemia falciforme, a identificação de novos *loci* associados a HbF continua a ser um esforço atual de investigação já que poderá vir a proporcionar a descoberta de novos alvos terapêuticos.

**Palavras chaves:** HbF; Hemoglobinopatias;  $\beta$ -talassemia; Reativação de HbF; SNP; Cluster  $\beta$ -globínico; Efeito cumulativo; *XmnI-HBG2*; *BCL11A*; *HMIP*.

## Abstract

---

In the healthy adult organism, fetal hemoglobin (HbF) represents less than 1% of total hemoglobin, which gives it little clinical importance in normal physiology. However, in certain hemoglobinopathies such as sickle cell anemia and  $\beta$ -thalassemia, increasing the level of HbF may be important as it improves the clinical condition of patients. After understanding how HbF regulation in the adult organism is dependent on genetic mechanisms, paved the way for the investigation and identification of loci involved in the process. To date, several association studies conducted on different population samples have identified three major loci involved in HbF regulation: the rs7482144 polymorphism, located in the promoter region of the *HBG2* gene, the *BCL11A* gene, and the *HMIP* intergenic region (HBS1L-MYB). Although, other investigations have identified new polymorphisms that may be involved in varying HbF levels, namely, LCR-5'HS4 (beta-globin locus control region) rs16912979, *KLF1* rs79334031, *DCHS2* rs61746132, *RNF113B* rs16955011 and *ARHGAP18* rs11759328.

The main objective of this dissertation was to study different candidate loci for HbF level regulators in a sample of Portuguese  $\beta$ -thalassemia minor subjects and to test their association with the variation of HbF levels. A total of 66 samples of individuals with  $\beta$ -thalassemia minor, 30 men and 36 women, aged 2 to 77 years, diagnosed at the Clinical Hematology Service of the Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra (CHUC) were studied. The subjects are healthy and asymptomatic, with HbF values between 0.2% and 9% and HbA2 levels between 3.4% and 6.8%. To determine the genotype, the following techniques were used i) restriction fragment length polymorphism (RFLP) using restriction enzymes after polymerase chain reaction (PCR); ii) TaqMan probes using real-time PCR; and iii) direct sequencing by using the Sanger method.

Linear regression analysis in additive model showed a statistically significant association with HbF levels for *BCL11A* rs1427407 ( $p = 0.03$ ), *HMIP* rs66650371 ( $p = 0.004$ ) and *XmnI-HBG2* rs7482144 ( $p = 0.004$ ) SNPs in Portuguese patients with  $\beta$ -thalassemia minor. SNPs *DCHS2* rs61746132, *RNF113B* rs16955011, *ARHGAP18* rs11759328, *KLF1* rs79334031 and LCR-5'HS4 rs16912979 showed no significant association with HbF levels ( $p > 0.05$ ). The study of the cumulative effect of minor alleles of the *BCL11A* rs1427407, *HMIP* rs66650371 and *XmnI-HBG2* rs7482144 SNPs showed

an increase in the strength of association with HbF levels with increasing number of minor alleles.

In conclusion, the results obtained in this study are consistent with the literature for the *XmnI-HBG2* rs7482144, *BCL11A* rs1427407 and *HMIP* rs66650371 loci associated with the regulation of HbF levels in different population samples with  $\beta$ -thalassemia minor. However, it was not possible to identify new genetic variants involved in the regulation of HbF in the study sample. Considering that the reactivation of HBG2 gene expression, with the consequent increase in HbF levels, would bring important clinical benefits for patients with  $\beta$ -thalassemia or sickle cell anemia, the identification of new HbF associated loci remains a current research effort as may provide the discovery of new therapeutic targets.

**Keywords:** HbF; Hemoglobinopathies;  $\beta$ -thalassemia; Reactivation of HbF; SNP;  $\beta$ -globin cluster; Cumulative effect; *XmnI-HBG2*; *BCL11A*; *HMIP*.

# Índice

---

Resumo.....	VII
Abstract .....	IX
Lista de Figuras.....	XIII
Lista de Tabelas .....	XV
Lista de Abreviaturas.....	XVII
<b>1. Introdução .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. As diferentes moléculas de Hemoglobina.....</b>	<b>2</b>
1.1.1 Os genes das Globinas .....	3
1.1.2 Os Distúrbios da Hemoglobina.....	5
a) $\beta$ -talassemia.....	6
1.2 Variabilidade genética associada ao aumento de HbF .....	8
<b>2. Material e Métodos .....</b>	<b>15</b>
2.1 Amostra .....	15
2.2 Seleção de polimorfismos para análise .....	16
2.3 Genotipagem .....	16
2.3.1 Amplificação da região alvo .....	17
2.3.2 Digestão com enzimas de restrição .....	21
2.4 Observação em eletroforese.....	22
2.5 Sequenciação .....	23
2.6 Análise estatística .....	24
<b>3. Resultados .....</b>	<b>27</b>
<b>4. Discussão .....</b>	<b>37</b>
<b>5. Conclusão .....</b>	<b>45</b>
<b>6. Referências .....</b>	<b>47</b>
Apêndice .....	57
Anexos.....	59



## Lista de Figuras

---

- Figura 1:** Estrutura da Hemoglobina Adulta.....1
- Figura 2:** A Estrutura dos aglomerados de genes da globina, com as diferentes hemoglobinas produzidas consoante o estágio de desenvolvimento.....4
- Figura 3:** Expressão dos genes da globina, as mudanças ocorridas de acordo com estágio de desenvolvimento humano.....5
- Figura 4:** Prevalência de  $\beta$ -talassemia em termos mundiais. Percentagem de população afetada 0-20% de indivíduos.....7
- Figura 5:** Ilustração de uma sonda TaqMan; F: Fluoróforo; Q: quencher.....20
- Figura 6:** Genótipos obtidos para a deleção de 3-pb do SNP rs66650371 (*HMIP*) por eletroforese horizontal em gel de poliacrilamida; 1,12: indivíduos homozigóticos para a deleção; 2, 3, 7, 8, 10, 11, 13, 14: indivíduos heterozigóticos (alelo normal e alelo deleção); 4,5,6, 9: Indivíduos homozigóticos sem deleção.....27
- Figura 7:** Genótipos obtidos para o polimorfismo rs7482144, *HBG2* através da técnica RFLP, por eletroforese horizontal em gel de poliacrilamida; 1,6,9: indivíduos heterozigóticos (TC); 2,3: indivíduos homozigóticos para o alelo derivado (TT); 4,5,7,8,10: Indivíduos homozigóticos para alelo ancestral (CC).....28
- Figura 8:** Genótipos obtidos para o polimorfismo rs11759328 (*ARHGAP18*) com recurso às sondas TaqMan em real time-PCR; a): genótipo homozigótico derivado (TT); b): genótipo homozigótico ancestral (CC); c): genótipo heterozigótico (CT).28
- Figura 9:** Genótipos obtidos para o polimorfismo rs1427407 *BCL11A*, através da sequenciação de sanger; a): genótipo heterozigótico (GT); b): genótipo homozigótico para o alelo derivado (TT).....29
- Figura 10:** Box-plots da distribuição do nível de HbF (log-transformada) dos polimorfismos rs1427407 (*BCL11A*), rs66650371 (*HMIP*) e rs7482144 (*XmnI-HBG2*), tendo em conta os genótipos: homozigótico para o alelo ancestral; heterozigótico; e homozigótico para o alelo derivado. ....32





## Lista de Tabelas

---

<b>Tabela 1:</b> Dados demográficos e parâmetros hematológicos dos indivíduos com $\beta$ -talassemia <i>minor</i> .....	15
<b>Tabela 2:</b> Genes selecionados para a análise de polimorfismo relacionados com o aumento de hemoglobina fetal. ....	16
<b>Tabela 3:</b> Componentes da mistura da reação de PCR, concentração e quantidade.....	17
<b>Tabela 4:</b> Protocolo de execução dos programas de amplificação de ADN por Polymerase Chain Reaction (PCR).....	18
<b>Tabela 5:</b> Primers e temperaturas de hibridização utilizadas para cada SNP para amplificação de ADN segundo a técnica de Polymerase Chain Reaction (PCR).....	19
<b>Tabela 6:</b> Protocolo de soluções para o estudo das amostras com sondas TaqMan.....	21
<b>Tabela 7:</b> Programa de amplificação por Real time-Polymerase Chain Reaction (real time-PCR).....	21
<b>Tabela 8:</b> Digestão de enzima para cada SNP com as condições de incubação.....	22
<b>Tabela 9:</b> Protocolo de Sequenciação.....	24
<b>Tabela 10:</b> Resultados da associação entre a HbF e os SNPs no grupo de indivíduos com $\beta$ -talassemia <i>minor</i> .....	31
<b>Tabela 11:</b> Comparação da média dos níveis de HbF entre os diferentes genótipos de cada SNP no grupo de indivíduos com $\beta$ -talassemia <i>minor</i> .....	33
<b>Tabela 12:</b> Frequência de haplótipos para os dois SNPs LCR-5'HS4 rs16912979 e <i>XmnI-HBG2</i> rs7482144 no cluster da Beta-globina e sua associação aos níveis de HbF.....	34
<b>Tabela 13:</b> Análise do efeito cumulativo dos alelos associados ao aumento de HbF, para os três SNPs: <i>BCL11A</i> rs1427407, <i>HMIP</i> rs66650371 e <i>XmnI-HBG2</i> rs7482144.....	35



## Lista de Abreviaturas

---

**A:** Adenina

**ADN:** Ácido desoxirribonucleico

**C:** Citosina

**Chr:** Cromossoma

**CHUC:** Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra

**CIAS:** Centro de Investigação em Antropologia e Saúde

**del:** Deleção

**Dir:** Direto

**EHW:** Equilíbrio de Hardy-Weinberg

**FRET:** Transferência de energia de ressonância fluorescente

**G:** Guanina

**GWAS:** Estudos de associação genómica ampla

**Hb:** Hemoglobina

**HbA:** Hemoglobina Adulta

**HBA1:** Gene Alfa 1-Globina

**HBA2:** Gene Alfa 2 -Globina

**HbA<sub>2</sub>:** Hemoglobina Adulta 2

**HBAP1:** Pseudogene Alfa Globina 1 ( $\psi\alpha 1$ )

**HBB:** Gene Beta-globina

**HBBP1:** Pseudogene Beta Globina ( $\psi\beta$ )

**HBD:** Gene Delta-Globina

**HBE:** Gene Épsilon-Globina

**HbF:** Hemoglobina Fetal

**HBG1 (<sup>A</sup> $\gamma$ ):** Gene Gama1-Globina (gama adenina- $\gamma$ A)

**HBG2 (<sup>G</sup> $\gamma$ ):** Gene Gama2-Globina (gama glicina- $\gamma$ G)

**HBM:** Gene Mu-Globina/ pseudogene alfa 2

**HBQ1:** Gene Theta1-Globina

**HBZ:** Gene Zeta-Globina

**HBZP1:** Pseudogene Zeta-Globina ( $\psi \zeta$ )

**IBM SPSS Statistics:** Statistical Package for the Social Sciences

**IC:** Intervalo de confiança

**LCR:** Região controlo do locus

**LCR-5'HS4:** Região controlo do locus beta-globina (*beta-globin locus control region*)

**M:** Molar

**MAF:** Frequências do alelo *minor*

**MgCl<sub>2</sub>:** Cloreto de magnésio

**p.Pro1676Lys:** Substituição de aminoácido de Prolina para Lisina;

**p.Val92Met:** Substituição de aminoácido de Valina para Metionina;

**pb:** par de base

**PCR:** *Polymerase Chain Reaction*

**QTL:** *loci* de características quantitativas

**Ref:** Referência

**Rev:** Reverso

**SE:** Erro padrão

**SNPs:** *single nucleotide polymorphisms*

**T:** Timina

**$\alpha$ :** alfa

**$\beta$ :** beta

**$\beta+$ :** produção reduzida

**$\beta0$ :** produção nula

**$\beta N$ :** produção normal

**$\gamma$ :** gama

**$\delta$ :** delta

**$\epsilon$ :** epsílon

**$\zeta$ :** zeta

**$\theta 1$ :** Theta1

**$\mu$ :** Mu





# 1. Introdução

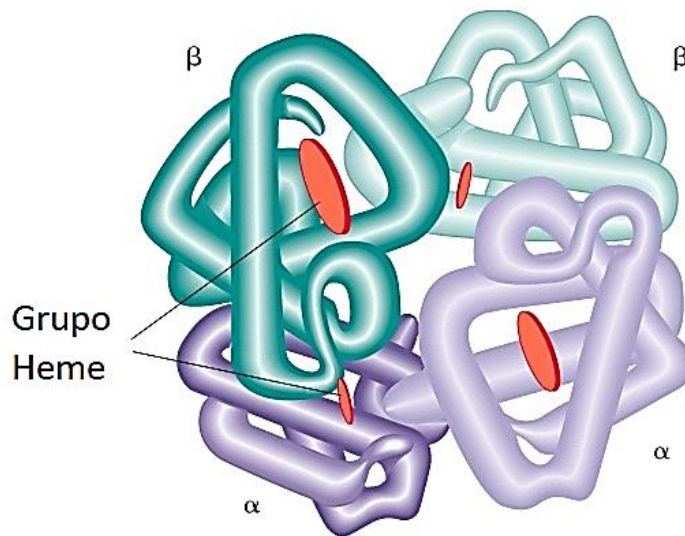
---

A hemoglobina fetal (HbF) é uma proteína produzida pelos precursores das células eritroides, entre as 10 e as 12 semanas de gestação, mantendo-se em circulação até aos primeiros 6 meses da vida pós-natal (Kaufman e Lappin, 2019). A partir desta idade, o corpo humano produz outras moléculas de hemoglobina (Hb), nomeadamente, as hemoglobinas adultas A (HbA) e A<sub>2</sub> (HbA<sub>2</sub>). A principal diferença entre a HbF e estas hemoglobinas adultas está relacionada com a sua afinidade por oxigénio. A HbF tem grande afinidade pelo oxigénio e a sua regulação envolve a ação de cofatores que favorecem o movimento do oxigénio da corrente sanguínea materna para a corrente sanguínea do feto e do embrião (Hardison, 2012; Kaufman e Lappin, 2019).

Devido à sua elevada afinidade pelo oxigénio, as propriedades fisiológicas da HbF podem ser utilizadas na gestão e tratamento de algumas hemoglobinopatias, tais como, a anemia falciforme e a talassemia (Thein *et al.*, 2007; Lettre, 2012; Sankaran e Orkin, 2013; Kaufman e Lappin, 2019). No caso da anemia falciforme, o aumento dos níveis de HbF no organismo adulto, na ordem dos 2 a 20% a partir do valor considerado normal, introduz melhorias nos sintomas clínicos da doença (Kaufman e Lappin, 2019). Por ter maior afinidade para o oxigénio e ser mais resistente à desoxigenação, a HbF contribui para a redução do número de crises dolorosas motivadas pela aglomeração de células falciformes nos vasos sanguíneos mais pequenos (Kaufman e Lappin, 2019). No caso da  $\beta$ -talassemia, caracterizada pelo decréscimo de produção de cadeias  $\beta$ -globínicas, a presença da HbF permite minorar os efeitos do excesso de cadeias alfa cuja precipitação impede a maturação das células eritroides e leva à sua morte (Basak e Sankaran, 2016), comprometendo a produção de glóbulos vermelhos. Em face destes benefícios torna-se imprescindível a compreensão dos mecanismos de regulação dos genes que codificam as globinas, de forma a ser possível a ativação da expressão da HbF em indivíduos que padeçam dos distúrbios da hemoglobina (Philipsen e Hardison, 2018).

## 1.1. As diferentes moléculas de Hemoglobina

A hemoglobina é uma proteína encontrada abundantemente nos eritrócitos. Estruturalmente, é um tetrâmero composto por dois grupos de cadeias peptídicas, os quais são compostos por duas cadeias alfa e duas cadeias não-alfa. As cadeias peptídicas são codificadas por genes presentes nos clusters  $\alpha$ -globínico e  $\beta$ -globínico (Schechter, 2008; Borg *et al.*, 2010; Thom *et al.*, 2013; McGann *et al.*, 2017; Teixeira *et al.*, 2018). Cada uma das cadeias peptídicas está ligada a um grupo prostético heme (Schechter, 2008; Thom *et al.*, 2013; McGann *et al.*, 2017) responsável pelo transporte do oxigénio (Moleirinho *et al.*, 2013) dos pulmões para os tecidos e do dióxido de carbono dos tecidos para os pulmões (Schechter, 2008; Thom *et al.*, 2013; Philipsen e Hardison, 2018). A ligação e libertação entre a hemoglobina e o oxigénio é ajustada e adaptada consoante as necessidades metabólicas e a ontogenia do organismo (Schechter, 2008; Thom *et al.*, 2013; Danjou *et al.*, 2015; Philipsen e Hardison, 2018).



**Figura 1:** Estrutura da HbA. Tetrâmero com quatro cadeias de globina, duas cadeias alfa e duas cadeias beta (parte proteica) e quatro grupos heme (grupo prostético) ligados a cada uma delas (Adaptado de Griffiths *et al.*, 2000).

As globinas são identificadas com letras do alfabeto grego e reúnem-se em dois grandes grupos: o das cadeias alfa (alfa- $\alpha$  e zeta- $\zeta$ ) e o das cadeias não-alfa (beta- $\beta$ , delta- $\delta$ , gama- $\gamma$  e epsilon- $\epsilon$ ) (Weatherall, 2001).



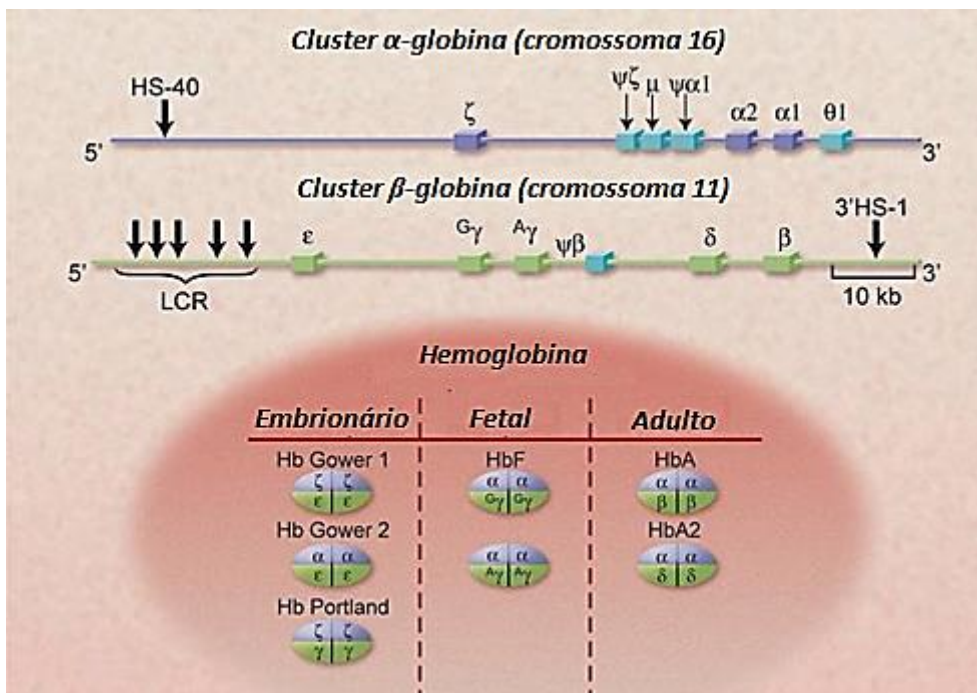
Existem diversos tipos de hemoglobina num indivíduo adulto saudável: i) a HbA ( $\alpha_2\beta_2$ ), que corresponde, em média, a 97% do total da hemoglobina presente nos glóbulos vermelhos; ii) a HbA<sub>2</sub> ( $\alpha_2\delta_2$ ) que corresponde a cerca de 2% da hemoglobina total; e iii) a HbF ( $\alpha_2\gamma_2$ ) que representa aproximadamente 1% da hemoglobina total (Weatherall, 2001; Modell e Darlison, 2008; Schechter, 2008; Teixeira *et al.*, 2018). Tal representatividade está relacionada com os padrões de expressão dos genes que codificam as cadeias globínicas (Weatherall, 2001; Schechter, 2008).

### 1.1.1 Os genes das Globinas

Os genes das globinas determinam a estrutura e a síntese das cadeias globínicas que constituem as diferentes hemoglobinas, desde o período embrionário até à vida adulta (Figura 2) (Weatherall, 2001; Johnson *et al.*, 2002; Neto e Pitombeira, 2002; Modell e Darlison, 2008; Schechter, 2008; Higgs e Forget, 2009; Borg *et al.*, 2010; Sankaran *et al.*, 2010; Moleirinho *et al.*, 2013; McGann *et al.*, 2017; Philipson e Hardison, 2018).

Os genes que codificam as cadeias alfa são dois,  $\alpha_2$  e  $\alpha_1$ , e estão agrupados numa região do cromossoma 16 designada por agrupamento génico da  $\alpha$ -globina ou cluster  $\alpha$ -globínico. Neste agrupamento existem outros genes e pseudogenes que não são expressos no genoma humano, estando distribuídos na região com a sequência 5' -  $\zeta$  (HBZ)-  $\psi\zeta$  (HBZP1) -  $\mu$  (HBM)-  $\psi\alpha_1$  (HBAP1) -  $\alpha_2$  (HBA2) -  $\alpha_1$  (HBA1) -  $\theta_1$  (HBQ1) - 3'. A 40 kb do gene zeta ( $\zeta$ ) situa-se o principal elemento regulador do locus da alfa-globina, o HS-40 (Chen *et al.*, 1997). As moléculas  $\alpha_2$  e  $\alpha_1$  são parálogas, o que significa que os genes que as codificam,  $\alpha_2$  (HBA2) e  $\alpha_1$  (HBA1), evoluíram por duplicação, muito provavelmente, num ancestral dos vertebrados mandibulados da superclasse Gnathostomata (Neto e Pitombeira, 2002; Borg *et al.*, 2010; Hardison, 2012; McGann *et al.*, 2017).

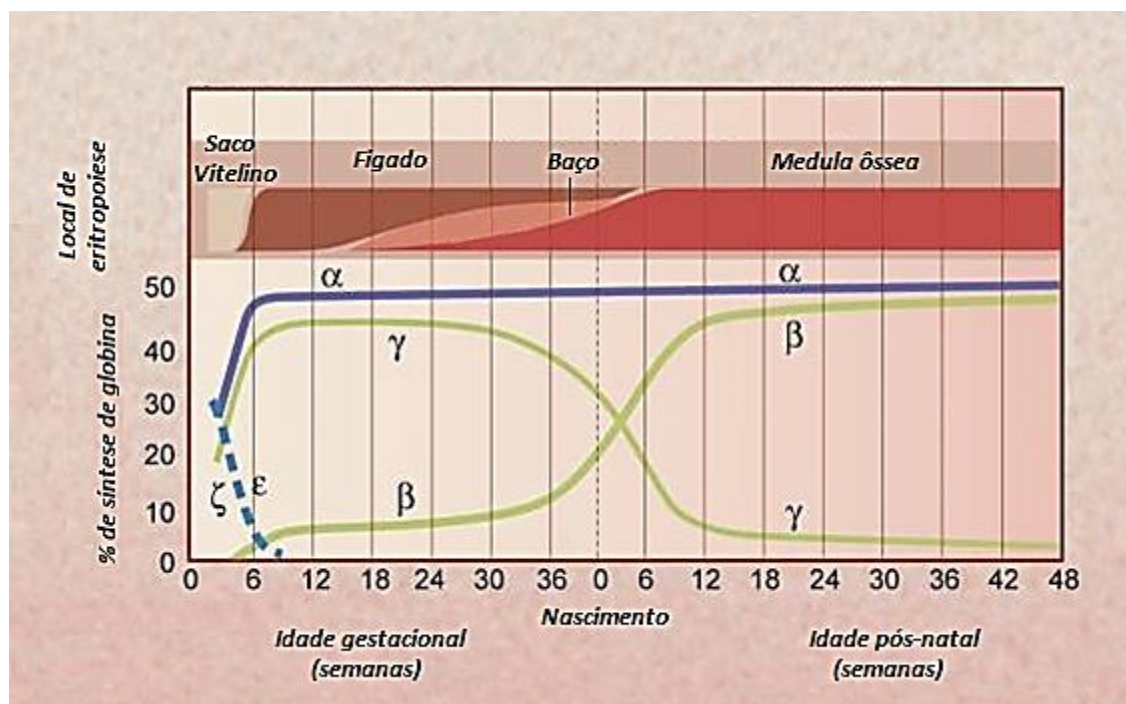
O cluster dos genes da  $\beta$ -globina está localizado no cromossoma 11 e apresenta a seguinte distribuição: 5'- $\epsilon$  (HBE)-  $G\gamma$  (HBG2)-  $A\gamma$  (HBG1)-  $\psi\beta$  (HBBP1)-  $\delta$  (HBD)-  $\beta$  (HBB)-3', juntamente com a região de controlo (LCR) procedem à transição do estágio embrionário (HBE), para o fetal (HBG2 e HBG1), e por último o estágio adulto (HBD e HBB) (Moleirinho *et al.*, 2013).



**Figura 2** A Estrutura dos aglomerados de genes da globina, com as diferentes hemoglobinas produzidas consoante o estágio de desenvolvimento (Adaptado da ilustração de Alice Y. Chen *in* Schechter, 2008).

Na 2<sup>a</sup>-3<sup>a</sup> semana de gestação (Figura 3), a eritropoiese (produção de eritrócitos) ocorre na vesícula umbilical (saco vitelino), na qual predominam as cadeias de ζ-globina e ε-globina identificada como hemoglobina *Gower I*. Na 5<sup>a</sup>/ 6<sup>a</sup> semana de gestação, a produção de eritrócitos é efetuada no fígado. A síntese das cadeias α-globina e de γ-globina começa a aumentar, resultando na Hb *Portland* (ζ<sub>2</sub>/γ<sub>2</sub>), Hb *Gower II* (α<sub>2</sub>/ε<sub>2</sub>), e por fim, é sintetizada a HbF (α<sub>2</sub>γ<sub>2</sub>). Na décima segunda semana de gestação e até à primeira infância a hemoglobina predominante é a HbF. A sua elevada afinidade pelo oxigénio, permite extrair o oxigénio da progenitora, promovendo dessa forma a oxigenação necessária dos tecidos. Após o nascimento existe um decréscimo na HbF visto que o meio ambiente providencia níveis elevados de oxigénio, logo não existe a necessidade de uma afinidade por oxigénio como seria necessário na vida intrauterina (McGann *et al.*, 2017). A produção de HbF é reduzida a favor da expressão do gene β-globina *HBB* (Jouini *et al.*, 2011; McGann *et al.*, 2017). A troca molecular de HbF para HbA ocorre através da ligação dos fatores de transcrição na sequência reguladora de ADN

que controlam a expressão dos genes do cluster das globinas (Danjou *et al.*, 2015). Após 6 meses do nascimento, a HbA torna-se predominante (McGann *et al.*, 2017).



**Figura 3** Expressão dos genes da globina, as mudanças ocorridas de acordo com estágio de desenvolvimento humano (Adaptado da ilustração de Alice Y. Chen *in* Schechter, 2008).

### 1.1.2 Os Distúrbios da Hemoglobina

Os distúrbios da Hb representam um grande problema de saúde pública, já que são os distúrbios genéticos mais comuns no mundo, afetando mais de 300 000 crianças (Weatherall *et al.*, 2006; Thein *et al.*, 2007; Modell e Darlison, 2008; Weatherall, 2010; Lettre, 2012; Sankaran, e Orkin, 2013; Sikdar, 2016). As hemoglobinopatias que apresentam maior morbidade e mortalidade são a anemia das células falciformes e as β-talassemias (Sikdar, 2016; Weatherall *et al.*, 2006), sendo responsáveis por cerca de 3,4% de mortes em crianças com idade inferior a 5 anos (Modell e Darlison, 2008). São doenças hereditárias, com transmissão autossômica recessiva (Costa *et al.*, 2018), e apresentam um padrão de distribuição geográfico onde a maior prevalência coincide com as regiões no mundo fustigadas pela malária (Taylor e Fairhursy, 2014; Chan *et al.*, 2016). Isso acontece devido à vantagem seletiva que esses distúrbios concedem contra a infecção por malária, aliviando na gravidade da doença ou na carga parasitária (Taylor *et al.*, 2013; Lu *et al.*, 2014; Taylor e Fairhursy, 2014; Lin *et al.*, 2015).

O controlo dos distúrbios da Hb têm tido um progresso considerável no que respeita à resposta e identificação. Porém, nos países mais pobres, o controlo continua a ser insatisfatório, existindo uma grande percentagem de casos de talassemia e anemia falciforme em que as respostas terapêuticas são reduzidas (Weatheral, 2010).

Por norma, os distúrbios da Hb apresentam fenótipos variáveis, desde a anemia severa, com necessidade de transfusões sanguíneas ao longo da vida, até anemias leves que não necessitam de tratamento (Danjou *et al.*, 2015). Estas variações dependem do defeito molecular do gene globínico e de outras variantes genéticas presentes no indivíduo, podendo essas variantes melhorar a severidade do fenótipo, como é o caso das variantes responsáveis pela presença dos níveis elevados da HbF, que compensam o desfalque da produção das outras hemoglobinas normais no adulto (Danjou *et al.*, 2015).

As hemoglobinopatias podem ser de carácter quantitativo ou qualitativo. As de carácter quantitativo podem resultar na ausência ou no decréscimo significativo da produção de uma das cadeias da globina, um exemplo que se enquadra nesta categoria são as síndromes talassémicas (Costa *et al.*, 2016; McGann *et al.*, 2017). No caso da  $\alpha$ -talassemia dá-se um decréscimo quantitativo na cadeia alfa globina, provocada, na maioria dos casos, pela deleção de um ou de ambos os genes de  $\alpha$ -globina no cromossoma 16 (Costa *et al.*, 2016; McGann *et al.*, 2017). A maioria das  $\beta$ -talassemias resulta de mutações pontuais no promotor *HBB*, nas sequências exónicas ou intrónicas, provocando a redução ou ausência da síntese da cadeia  $\beta$ -globina (Nienhuis e Nathan, 2012; Thein, 2013; Danjou *et al.*, 2015; McGann *et al.*, 2017). A anemia falciforme (HbSS) é um caso de desordem qualitativa, resultante de um defeito estrutural na cadeia  $\beta$ -globina em que o codão 6 GAG (ácido glutâmico) é convertido em GTG (valina) (Costa *et al.*, 2016; McGann *et al.*, 2017).

### **a) $\beta$ -talassemia**

Na população humana, as mutações que provocam  $\beta$ -talassemia surgiram, primeiramente, na região do mediterrâneo, passando para Oriente, Índia e Ásia (McGann *et al.*, 2017). Porém, através dos processos migratórios passou a apresentar uma distribuição global (Figura 4) (Cao e Kan, 2013; Costa *et al.*, 2016; McGann *et al.*, 2017). Em Portugal, as mutações mais frequentes são: codão 39(C>T), ISVI-1 (G>A), IVSI-6

(T>C), e IVSI-110 (G>A), que apresentam assimetria na sua distribuição pelo país (Ribeiro *et al.*, 1997; Constanço *et al.*, 2011; Teixeira *et al.*, 2018), sendo mais prevalentes no sul (Teixeira *et al.*, 2018). A incidência esperada de indivíduos afetados com esse distúrbio é de 6 nascimentos por ano. Relativamente à região central de Portugal, 1,6% da população é portadora de  $\beta$ -talassemia (Ithamet, 2019).



**Figura 4:** Prevalência de  $\beta$ -talassemia em termos mundiais. Percentagem de população afetada 0-20% de indivíduos (ithamap, 2019).

Devido à anomalia de produção de  $\beta$ -globina, os indivíduos com  $\beta$ -talassemia, apresentam um desequilíbrio que provoca o excesso de  $\alpha$ -globina resultando numa eritropoiese ineficaz provocando uma sobrevivência reduzida dos glóbulos vermelhos (Nienhuis e Nathan, 2012).

As  $\beta$ -talassemias apresentam um padrão clínico heterogéneo e podem ser classificadas em três grupos, consoante a sua severidade e modificação genética associada, assim temos a  $\beta$ -talassemia *major*, a  $\beta$ -talassemia intermédia e a  $\beta$ -talassemia *minor* (Nienhuis e Nathan, 2012; Thein, 2013; McGann *et al.*, 2017). Destas três formas, a  $\beta$ -talassemia *major* é a mais severa, podendo estar presente na forma homozigótica (mutações  $\beta^0/\beta^0$ ) ou heterozigótica composta (mutações  $\beta^0/\beta^+$ ). A mutação afeta severamente a produção de  $\beta$ -globina e, conseqüentemente, a sua produção pode ser nula ( $\beta^0$ ) ou reduzida ( $\beta^+$ ) (Weatherall, 2001; McGann *et al.*, 2017). Nestes casos existe um descontrolo acentuado no balanço entre as cadeias de  $\alpha:\beta$  (Weatherall, 2001; McGann *et al.*, 2017).

No que concerne à  $\beta$ -talassemia intermédia, esta apresenta um padrão menos severo relativamente à *major*. Contudo, continua a ser uma desordem que requer cuidados médicos e terapêuticos. Normalmente, na  $\beta$ -talassemia intermédia, os dois *loci* do gene  $\beta$ -globina são afetados  $\beta^+/\beta^+$  ou  $\beta^0/\beta^+$  (podendo ocorrer  $\beta^0/\beta^0$  com modificações genéticas melhorativas) (Weatherall, 2001; McGann *et al.*, 2017).

Relativamente à  $\beta$ -talassemia *minor*, os indivíduos são heterozigóticos para uma mutação no gene *HBB* ( $\beta^+/\beta^N$  ou  $\beta^0/\beta^N$ ). Não são observadas manifestações clínicas significativas nos indivíduos afetados (Weatherall, 2001; McGann *et al.*, 2017), contudo em alguns casos, os pacientes apresentam anemia leve (Nienhuis e Nathan, 2012). Do desequilíbrio entre as cadeias  $\alpha$  e  $\beta$ -globina resulta um aumento de HbA2 superior a 3,5% devido ao excesso de cadeias  $\alpha$ -globina que se associa à  $\delta$ -globina (McGann *et al.*, 2017).

## 1.2 Variabilidade genética associada ao aumento de HbF

A troca de HbF para hemoglobina adulta (HbA) e o silenciamento da produção de HbF têm sido áreas de investigação com elevado interesse em hematologia nos últimos anos, na medida em que a indução clínica da síntese de HbF melhora os sintomas clínicos de doenças como a  $\beta$ -talassemia e a anemia falciforme (Thein *et al.*, 2009; Schechter, 2008; Borg *et al.*, 2010; Lettre, 2012; Nienhuis e Nathan, 2012; He *et al.*, 2018). A indução de HbF por ação da hidroxiureia continua a ser um dos tratamentos mais utilizados para a anemia falciforme na medida em que atenua os sintomas clínicos da anemia (Thein 2017).

A produção de HbF não é completamente anulada ao nascimento e todos os adultos continuam a produzir quantidades residuais de HbF. Estudos em gémeos demonstraram que a quantidade de HbF em adultos é, no essencial, geneticamente controlada (89%), mas a etiologia genética é complexa (Thein 2017). Neste sentido, a identificação dos genes ou variantes genéticas, bem como a compreensão dos mecanismos moleculares que relacionam os fatores genéticos poderão revelar novos alvos terapêuticos e novas abordagens farmacológicas para atenuar os sintomas da anemia falciforme e das formas graves de talassemia (Crawford, 2007; Uda *et al.*, 2008; Thein e Menzel, 2009; Thein *et al.*, 2009; Borg *et al.*, 2010; Lettre, 2012, Sankaran e Orkin, 2013; He *et al.*, 2017; Thein, 2018).

### 1.2.1 *Loci* principais associados ao aumento de HbF

Através de estudos epidemiológicos e estudos de associação genômica ampla (na sigla inglesa GWAS- *genome-wide association study*), diversos *loci* foram associados ao aumento dos níveis de HbF em doentes com  $\beta$ -talassemia ou anemia falciforme, de origem asiática, africana e europeia, nomeadamente os polimorfismos: i) rs7482144 (C/T) (também conhecido por *XmnI*), situado na posição -158 da região promotora do gene *HBG2* localizado no cromossoma 11p15; ii) a região intergénica *HMIP* (localizada entre os genes *HBSIL-MYB*), localizada no cromossoma 6q23; iii) e o gene *BCL11A*, presente no cromossoma 2p16. Os polimorfismos situados nestas três regiões contribuem com 20-50% da variação de HbF, sendo considerados os três principais *loci* de características quantitativas (QTL – *quantitative trait loci*) associados à variabilidade de HbF (Thein e Menzel, 2009; Thein *et al.*, 2009; Chan *et al.*, 2016). A restante base genética associada à variabilidade de HbF permanece desconhecida e poderá envolver outros *loci* com contribuição modesta (Thein e Menzel, 2009).

O polimorfismo *XmnI-HBG2* rs7482144 é uma variante comum em todos os grupos populacionais o que a torna um achado revelante para a clínica das hemoglobinopatias. A sua influência nos níveis de HbF foi há muito identificada em estudos clínicos e epidemiológicos e comprovada em diversos grupos populacionais (Labie *et al.*, 1985a; Thein *et al.*, 1987; Weatherall e Clegg, 2001 in Thein, e Menzel, 2009). Porém, apesar da sua descoberta, o significado funcional desta mutação ainda não foi esclarecido, e existe a possibilidade de estar em desequilíbrio de ligação com um outro polimorfismo no *cluster* da  $\beta$ -globina (Weatherall, 2012). Esse desequilíbrio foi evidenciado através de um trabalho efetuado por Neishabury *et al.* (2011), no qual é referido que o polimorfismo rs7482144 se encontra em desequilíbrio de ligação com um polimorfismo situado na região de controlo (LCR) do locus  $\beta$ -globina no local 5'HS4.

Como já foi referido anteriormente, os polimorfismos situados nos genes *BCL11A* e *HBSIL-MYB* (*HMIP*) estão associados ao aumento de HbF. Num estudo efetuado por Farrel *et al.* (2011) em indivíduos chineses heterozigóticos para  $\beta$ -talassemia, a variabilidade de HbF resultante dos polimorfismos localizados na região *HMIP* foi estimada em cerca de 13,5% e o gene *BCL11A* seria responsável por 6,4% da variação de HbF nessa amostra (Farrel *et al.*, 2011).

No que diz respeito aos polimorfismos situados no gene *HMIP*, o estudo realizado por Farrel *et al.* (2011), descreve uma deleção de três pares de bases (del 3-pb TAC) (rs9399137) que está em desequilíbrio de ligação com o polimorfismo rs9399137, o mais conhecido e associado ao aumento de HbF entre as populações europeias, africanas e chinesas. Para Farrel *et al.* (2011), a deleção de 3-pb é possivelmente o polimorfismo mais significativo da região *HMIP* na modulação de HbF.

Relativamente ao gene *BCL11A*, este foi identificado como um repressor quantitativo, tendo já sido realizadas manipulações na sua expressão através de abordagem genómicas e de edição genética, de forma a auxiliar em novos alvos terapêuticos para o tratamento das hemoglobinopatias (Thein, 2018). O aumento dos níveis de HbF estão associados à redução da expressão do gene *BCL11A* (Sankaran *et al.*, 2008). A regulação negativa do gene leva ao aumento da expressão de HbF, visto que esse gene tem um papel direto na regulação do gene da  $\beta$ -globina. A proteína BCL11A não interage diretamente com o promotor do gene gama, mas ocupa diversos locais no *cluster* da  $\beta$ -globina reprimindo a expressão do gene gama-globínico (Thein 2018). No estudo realizado por Uda *et al.* (2008) na população da Sardenha identificou-se a associação dos níveis de HbF com diversas variantes localizadas no gene *BCL11A*, incluindo o SNP rs11886868 com valores  $p = 10^{-35}$ ). Outros estudos de associação revelaram que o SNP *BCL11A* rs1427407 mostra uma forte associação com HbF em doentes com anemia falciforme (Bauer *et al.*, 2013). Estas associações entre os polimorfismos situados no gene *BCL11A* e os níveis de HbF foram identificadas em diversas hemoglobinopatias, auxiliando na melhoria da caracterização do fenótipo associado aos distúrbios da hemoglobina (Uda *et al.*, 2008). Assim, o gene *BCL11A* surge como um bom alvo terapêutico para a reativação da HbF (Sankaran *et al.*, 2008).



## 1.2.2 Outros *loci* associados ao aumento de HbF

Além dos três principais QTL associados ao aumento de HbF (*XmnI-HBG2*, *HMIP* e *BCL11A*), outros trabalhos evidenciaram a existência no genoma de outros genes e polimorfismos genéticos potencialmente associados ao aumento HbF.

### a) *LCR-5'HS4*

A região *LCR-5'HS4* (*beta-globin locus control region*) faz a regulação da expressão dos genes gama e beta globínicos através de ligação de fatores de transcrição, os quais são responsáveis pela regulação da expressão dos genes, com o objetivo de garantir a expressão correta em termos de momento e quantidade (Neishabury *et al.*, 2012). Neishabury *et al.* (2011), numa amostra iraniana composta por doentes com  $\beta$ -talassemia intermédia identificaram um polimorfismo A/G na região palindrômica *LCR-5'HS4*. O estudo sugeriu que os SNPs presentes na região central do *LCR 5'HS4* teriam um impacto no fenótipo da talassemia em indivíduos iranianos e os investigadores sugeriram que esse local, nomeadamente o polimorfismo rs16912979 A>G, seria um possível candidato funcional associado ao polimorfismo *XmnI-HBG2* na modificação do fenótipo de HbF.

### b) Genes *DCHS2* e *RNF113B*

Num estudo recente, Sheehan e colaboradores (2014) identificaram, por sequenciação massiva de exomas, diversas variantes influenciadoras da resposta à indução da síntese de HbF por hidroxiureia numa coorte pediátrica de doentes com anemia falciforme de origem africana. Esta investigação tinha como objetivo usar a abordagem farmacogenómica para investigar a associação fenótipo-genótipo através da sequenciação completa do exoma em crianças com anemia falciforme, tratadas com hidroxiureia. Foram identificadas diversas variantes raras e comuns associadas à indução de HbF por hidroxiureia, em particular, duas variantes funcionais, rs61746132 (p.Pro1676Lys) no gene *DCHS2* e rs16955011 (p.Val92Met) no gene *RNF113B*, com frequências do alelo *minor* (MAF) >10% (Sheehan *et al.*, 2014).

c) Gene *ARHGAP18*

Num outro trabalho recente foram explorados e analisados diversos dados sobre o genoma humano que evidenciassem a ação da seleção natural positiva ao nível dos SNPs (He *et al.*, 2017). Através da aplicação *Haplotter*, disponível *online*, foram observados os principais resultados associados a episódios de seleção positiva no genoma humano com base em dados do *HapMap*. O estudo foi realizado numa amostra de 1141 indivíduos chineses com  $\beta$ -talassemia e as análises bioinformáticas corroboraram a associação entre polimorfismos genéticos e níveis de HbF (He *et al.*, 2017). Os resultados demonstraram que o SNP rs 11759328, localizado no gene *ARHGAP18*, estaria relacionado, significativamente, com o aumento dos níveis de HbF ( $p = 5.1e^{-4}$ ) e teria estado sujeito a uma seleção positiva para o aumento dos níveis de HbF em indivíduos com  $\beta$ -talassemia (He *et al.*, 2017).

d) Gene *KLF1*

O gene *KLF1*, localizado no cromossoma 19, codifica um fator de transcrição que se liga à região promotora do gene beta e induz a expressão dos genes da beta globina e outros genes eritroides, necessário para a adequada maturação das células eritroides e desempenhando um papel importante na troca da expressão de globinas. As mutações no gene *KLF1* podem resultar numa ampla diversidade de fenótipos hematológicos (Waye, e Eng, 2015). No caso de distúrbios benignos, resultantes da haploinsuficiência de KLF, estes são considerados funcionais, pois os portadores apresentam níveis elevados de HbF ou de HbA2 (Waye, e Eng, 2015).

Uma investigação realizada em indivíduos de ascendência africana, indiana e do sudeste asiático, mostrou que as mutações no gene *KLF1* estavam presentes de forma significativa no grupo de indivíduos com os níveis aumentados de HbF (Gallienne *et al.*, 2012). O mecanismo proposto para que as mutações no *KLF1* estivessem a provocar o aumento de HbF seria a redução da ativação do *BCL11A*, o que provocaria uma insuficiência indireta na repressão da síntese de  $\gamma$ -globina (Gallienne *et al.*, 2012). Essa associação entre os genes *KLF1* e o *BCL11A* já tinha sido reconhecida noutra estudo anterior (Borg *et al.*, 2010), sendo referido que o *Knockdown* do *KLF1* provocava a diminuição da expressão de *BCL11A*.

No estudo de Gallienne *et al.* (2012) foi ainda identificada uma mutação no promotor do gene *KLF1* (-148G> A) associada ao aumento dos níveis de HbF. Esta mutação está localizada dentro de um sítio de ligação do fator de transcrição Sp1, resultando na redução da expressão do gene *KLF1 in vivo* (Gallienne *et al.*, 2012).

### 1.3 Objetivos

O objetivo principal deste trabalho foi identificar variações genéticas associadas ao aumento de HbF numa amostra de indivíduos portugueses com  $\beta$ -talassemia *minor*. Para isso, foram selecionados:

- i) três polimorfismos localizados nos três QTL principais *XmnI-HBG2* rs7482144, *HMIP* rs66650371 (del 3pb) e *BCL11A* rs1427407, já conhecidos como estando associados a HbF noutras populações com  $\beta$ -talassemia *minor*;
- ii) outros polimorfismos previamente descritos noutras regiões genómicas, potencialmente envolvidos na regulação de HbF, nomeadamente, os SNPs *LCR-5'HS4* rs16912979, *RNF113B* rs16955011, *KLF1* rs79334031 (-148A/G), *DCHS2* rs61746132 e *ARHGAP18* rs11759328.



## 2. Material e Métodos

---

### 2.1 Amostra

Para o estudo genético dos polimorfismos associados ao aumento de HbF foram recolhidas 66 amostras sanguíneas de indivíduos portugueses com  $\beta$ -talassemia *minor* (heterozigóticos para mutações no gene *HBB*), diagnosticados no Serviço de Hematologia Clínica do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra (CHUC). Os indivíduos com  $\beta$ -talassemia *minor* são saudáveis e assintomáticos sendo o diagnóstico feito pela presença aumentada de HbA2 ( $\geq 3,5\%$ ).

Como está descrito na Tabela 1, a amostra é constituída por 30 indivíduos do sexo masculino e 36 do sexo feminino, com idades compreendidas entre os 2 e os 77 anos. Relativamente aos parâmetros hematológicos apresentam valores de HbF entre os 0,2% e 9% e de HbA2, entre 3,4% e 6,8%.

A sequência do gene *HBB* foi analisada por sequenciação direta, tendo sido identificadas seis mutações diferentes. As duas mutações mais comuns foram c.92+6T>C [IVSI-6 (T>C)] (n=25) e c.118C>T [CD39 CAG> TAG] (n=20). Foram ainda encontradas as seguintes mutações: c.48G>A [CD15 TGG>TGA] (n=10), c.92+1G>A [IVS-I-1 (G>A)] (n=8) e c.93-21G>A [IVSI-110 G>A] (n=3).

**Tabela 1: Dados demográficos e parâmetros hematológicos dos indivíduos com  $\beta$ - talassemia *minor*.**

Características	Valores
Idade média (SE)	32,12 ( $\pm 2,67$ )
Idade (mín-máx)	2-77
Masculino (n)	30
Feminino (n)	36
<b>Parâmetros Hematológicos</b>	
HbF média (SE)	2,19 ( $\pm 0,26$ )
HbF (mín-máx)	0,2-9,0
HbA2 média (SE)	4,77 ( $\pm 0,92$ )
HbA2 (mín-máx)	3,4-6,8

**Abreviaturas:** SE: Erro padrão; mín-máx: valores de mínimo e máximo; n: número.

## 2.2 Seleção de polimorfismos para análise

Com o objetivo de analisar variantes genéticas que pudessem estar relacionados com o aumento de HbF na população portuguesa, foi realizada uma pesquisa bibliográfica, da qual foi possível selecionar os oito polimorfismos utilizados neste trabalho (Tabela 2).

**Tabela 2: Genes e polimorfismos selecionados para estudo de associação com o aumento de HbF.**

Chr: posição	Gene	SNP	Referência
2: 60490908	BCL11A	rs1427407	Menzel <i>et al.</i> , 2007; Bauer <i>et al.</i> , 2013
4:154235260	DCHS2	rs61746132	Sheehan <i>et al.</i> , 2014
6: 129691228	ARHGAP18	rs11759328	He <i>et al.</i> , 2017
6: 135097495-497	HMIP	rs66650371	Farrel <i>et al.</i> , 2011; Thein e Menzel, 2009
11: 5254939	HBG2	rs7482144	Neishabury <i>et al.</i> , 2012
11: 5288465	LCR-5'HS4	rs16912979	Neishabury <i>et al.</i> , 2012
13:98176963	RNF113B	rs16955011	Sheehan <i>et al.</i> , 2014
19: 12887288	KLF1	rs79334031	Radmilovic <i>et al.</i> , 2012

Abreviaturas: Chr: Cromossoma.

## 2.3 Genotipagem

A análise laboratorial foi realizada no Laboratório de Genética Humana do Centro de Investigação em Antropologia e Saúde (CIAS), do Departamento de Ciências da Vida da Universidade de Coimbra.

A extração de ADN genómico de algumas amostras sanguíneas foi previamente realizada no laboratório da Unidade de Hematologia Molecular do Hospital Pediátrico de Coimbra (CHUC), e as restantes extrações foram efetuadas no Laboratório de Genética Humana (CIAS), recorrendo ao *FavorPrep™ Genomic DNA Mini Kit* (Favorgen Biotech Corp., Taiwan), seguindo com as recomendações do fabricante (anexo 1).

Os polimorfismos *BCL11A* rs1427407, *DCHS2* rs61746132, *HBG2* rs7482144, *LCR-5'HS4* rs16912979, *RNF113B* rs16955011 e *KLF1* rs79334031 foram estudados por *Restriction fragment length polymorphism* (RFLP) recorrendo a enzimas de restrição.

O polimorfismo *HMIP* rs66650371 (3 pb-del) foi estudado por electroforese em gel horizontal de poliacrilamida (10%) após amplificação por *Polymerase Chain Reaction* (PCR) utilizando 2 pares de *primers*, específicos para cada alelo (*amplification refractory mutation system*), de acordo com Farrell et al. (2011).

O polimorfismo do gene *ARHGAP* rs11759328 foi estudado com sondas TaqMan por *real time-PCR* através do equipamento GFX 96<sup>Tm</sup> Real-TimeSystem C1000 Touch Thermol Cycler (BioRad laboratories, CA, USA).

Para as sequenciações de Sanger foi utilizado o sequenciador automático ABI 3130 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) localizado no laboratório de Hematologia do Hospital Pediátrico de Coimbra.

### 2.3.1 Amplificação da região alvo

#### a) Amplificação de ADN por *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

A reacção em cadeia da polimerase (na sigla inglesa PCR - *Polymerase Chain Reaction*) é uma metodologia utilizada para a amplificação de fragmentos de ADN utilizando a enzima Taq DNA-polimerase, responsável pela replicação do material genético através da síntese de uma sequência complementar do ADN alvo de estudo. Através dos *primers* a sequência a ser replicada é identificada e copiada milhares a milhões de vezes (Novais *et al.*, 2004).

Para analisar os diferentes polimorfismos das amostras foram realizadas amplificações da região alvo por PCR. Na tabela 3 estão descritos os constituintes da solução de reacção, a sua concentração e quantidades.

**Tabela 3: Componentes da mistura da reacção de PCR, concentração e quantidade.**

Reagentes	Volume por amostra ( $\mu$ l)
Água bi-destilada	16,5 $\mu$ l
Tampão 10x	2,5 $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	3 $\mu$ l
dNTPs (10 mM cada)	0,5 $\mu$ l
Primer direto (100 ng/ $\mu$ l)	0,5 $\mu$ l
Primer reverso (100 ng/ $\mu$ l)	0,5 $\mu$ l
Taq (5 U/ $\mu$ l)	0,1 $\mu$ l

ADN	1,5 $\mu$ l
Volume final	25 $\mu$ l

O protocolo de execução da amplificação (Tabela 4), foi realizado no termociclador TProfessional (Biometra). Procedeu-se à desnaturação inicial durante 5 minutos a 94°C, de seguida realizou-se 35 ciclos que consistiram na desnaturação a 94°C durante 45 segundos, hibridização dos *primers* durante 45 segundos (dependendo do *primers* a temperatura de hibridização variou entre 52°C e 62°C; consultar tabela 5) e extensão a 72°C durante 45 segundos. Foi feita uma extensão final da cadeia de ADN a 72°C durante 5 minutos.

**Tabela 4: Protocolo de execução do programa de amplificação por PCR**

Fase	Temperatura	Tempo	Ciclos
Desnaturação Inicial	94°C	5 min.	1x
Desnaturação	94°C	30seg.	35x
Hibridização	52-62°C	45seg.	
Extensão	72°C	45 seg.	
Extensão final	72°C	5 min.	
Manutenção	8°C	$\infty$	

**Abreviaturas:** seg: segundos; min: minutos.

Relativamente aos *primers* utilizados na amplificação de ADN por PCR, os mesmos são discriminados na Tabela 5, na qual é possível observar os genes, o SNPs e as sequências dos *primers* utilizados, como a referência do local/ artigo onde foi obtido a sequenciação. Na inexistência de artigo foi realizada uma busca de *primers* recorrendo ao programa Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/>) (Rozen e Skaletsky, 2000).



**Tabela 5: Primers e temperaturas de hibridização utilizadas para cada SNP para amplificação de ADN segundo a técnica de *Polymerase Chain Reaction* (PCR).**

Gene	SNP	Primers	Temp	Ref
BCL11A	rs1427407	<b>Dir:</b> 5'-CCTAAAAGGGAAGTTATTTTTCCA-3' <b>Rev:</b> 5'-TTTGCTCTTCTCCAGGGTGT-3'	58°C	*
DCHS2	rs61746132	<b>Dir:</b> 5'-GCAGTCACCATCACATCAG-3' <b>Rev:</b> 5'-GCCACTGTTCTGTGGAAGGA-3'	60°C	*
ARHGAP18	rs11759328	<b>Dir:</b> 5'-GTTTATGGGGAAGGAAGGA-3' <b>Rev:</b> 5'-GGGGCCAAAGTCTGTGTAGT-3'	58°C	*
HMIP	rs66650371	<b>Dir:</b> 5'-TCACTCTGGACAGCAGATGTTACTAT-3' <b>Rev:</b> 5'-CTCAGTGATGGTATTTCTGGAGAC-3'	60°C	Farrell <i>et al.</i> (2011)
		<b>Dir:</b> 5'-AGCCCGTCCAGACACTCATTGTT-3' <b>Rev:</b> 5'-CCCTGATAACATTTTGTGGTTTTTCATTTAACAT-3'		
HBG2	rs7482144	<b>Dir:</b> 5'-AACTGTTGCTTTATAGGATTTTT-3' <b>Rev:</b> 5'-AGGAGCTTATTGATAACCTCAGAC-3'	58°C	Sutton <i>et al.</i> (1989)
LCR-5'HS4	rs16912979	<b>Dir:</b> 5'-CACAACGACCCATATAGACA-3' <b>Rev:</b> 5'-GGAAATCATTACTCCAGACTC-3'	52°C	Faà <i>et al.</i> (2006)
RNF113B	rs16955011	<b>Dir:</b> 5'-GGTGCCTGCTCGAAGTCA-3' <b>Rev:</b> 5'-CTCCACAGCTGGCAGAAGG-3'	62°C	*
KLF1	rs79334031	<b>Dir:</b> 5'-TTGACTTGGCTTTGGACACA-3' <b>Rev:</b> 5'-GAGGGCTCCTCTGTGCCTT-3'	62°C	*

**Abreviaturas:** Dir: direto; Rev: reverso; Temp: Temperatura de hibridização; Ref: Referência; \*Primers obtidos através do programa Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/>).

## b) Amplificação por real time-PCR com Sondas de TaqMan

A análise em *Real Time-PCR* foi apenas efetuada no estudo do polimorfismo rs11759328 do gene *ARHGAP18*, utilizando o kit C\_2465575\_20 (Applied Biosystems, Foster City, USA). O protocolo da reação encontra-se discriminado na Tabela 6.

As sondas TaqMan são usadas para amplificação e detecção de variações na sequência de ADN através da emissão de sinal fluorescente, provocado pela degradação da sonda durante a atividade da enzima polimerase. A sonda TaqMan é constituída por um corante *reporter* fluorescente na extremidade 5' e um silenciador (*quencher*) na extremidade 3' (figura 5). O Silenciador (*quencher*) reduz a fluorescência emitida pelo corante do *reporter*, através da transferência de energia de ressonância fluorescente (FRET). Quando a *taq polimerase* atinge a sonda ela cliva a molécula, o que faz com que o corante *reporter* se separe do corante silenciador, resultando no aumento do sinal do corante *repórter*, detetando-se assim através da intensidade da fluorescência do corante no produto alvo.



**Figura 5:** Ilustração de uma sonda TaqMan; F: Fluoróforo; Q: quencher (Novais *et al.*, 2004).

Neste processo de discriminação alélica a amplificação da região do SNP estudada foi discriminada através de sondas específicas para cada alelo do SNP, sendo essas o Fluoróforo FAM e o Fluoróforo HEX.

**Tabela 6: Protocolo de soluções para o estudo das amostras com sondas TaqMan.**

Reagentes	Volume por Amostra ( $\mu$ l)
Água bi-destilada	10 $\mu$ l
Mix (2x)	12,5 $\mu$ l
Sonda (20x)	0,5 $\mu$ l
ADN	2 $\mu$ l
Volume final	25 $\mu$ l

As amplificações foram realizadas num GFX 96<sup>Tm</sup> Real-TimeSystem C1000 Touch Thermol Cycler (BioRad laboratories, CA, USA). Como é possível observar na Tabela 7, iniciou-se a desnaturação a uma temperatura de 95°C durante 10 minutos e um ciclo de 40 repetições que compreendiam a desnaturação a 90°C durante 15 segundos e a hibridização/extensão a 60°C durante 1 minuto.

**Tabela 7: Programa de amplificação por *real time-PCR***

Fase	Temperatura	Tempo	Ciclos
Desnaturação inicial	95°C	10 min.	1
Desnaturação	90°C	15 seg.	40
Hibridização/ Extensão	60°C	1 min.	

**Abreviaturas:** seg: segundos; min: minutos.

### 2.3.2 Digestão com enzimas de restrição

As enzimas de restrição permitem isolar fragmentos de ADN com base na sua capacidade para reconhecer sequências específicas de nucleótidos. Após a digestão é possível observar os diferentes fragmentos resultantes do corte efetuado pela enzima de restrição através de eletroforese em gel (Susanne, 2003). Deste modo, é possível fazer a discriminação alélica através do padrão de migração dos diferentes fragmentos produzidos durante a digestão. Na Tabela 8 é possível observar as enzimas de restrição utilizadas neste trabalho para cada SNP juntamente com as condições de incubação.

**Tabela 8: Digestão de enzima para cada SNP com as condições de incubação.**

Gene	SNP	Enzima	Fragmento	Condições incubação (Temp /Duração)
BCL11A	rs1427407	HpyCH 4 III	Alelo G:137+76 Alelo T:213 Fragmento PCR:213 pb	37° C / 16h
DCHS2	rs61746132	Nla IV	Alelo G: 76+ 122 Alelo A: 188 Fragmento PCR:188 pb	37° C / 16h
HBG2	rs7482144	Xmnl	Alelo C:657 Alelo T:207+450 Fragmento PCR:657 pb	37° C / 16h
LCR-5'HS4	rs16912979	HAE III	Alelo A: 457+ 333+57 Alelo G: 333+282+175+57 Fragmento PCR: 847pb	37°C / 16h
RNF113B	rs16955011	NlaIII	Alelo C:116+34 Alelo T:34+48+68 Fragmento PCR: 150 pb	37°C / 16h
KLF1	rs79334031	FauI	Alelo G:95+61 Alelo A:156 Fragmento PCR:156 pb	55° C / 16h

Abreviaturas: Temp: tempo.

## 2.4 Observação em eletroforese

### Visualização por eletroforese em gel de agarose

O ADN é uma molécula que possui carga negativa devido à presença de grupos fosfato como constituintes dos nucleótidos. Quando é inserido numa matriz de gel, submetida a um campo elétrico, tende a deslocar-se em direção ao polo positivo (Corrêa e Possik, 2012). A velocidade com que os fragmentos de ADN se movem no gel depende

do seu tamanho, permitindo, a dado momento, distinguir os fragmentos maiores, que se deslocam mais lentamente, dos mais pequenos, que deslocam mais rapidamente.

A observação dos fragmentos de ADN foi efetuada por eletroforese em gel de agarose a 2%, corados com brometo de etídio e visualizados à luz ultravioleta, ou em gel horizontal de poliacrilamida a 10%, seguida de coloração com nitrato de prata.

Neste trabalho a eletroforese foi utilizada para duas finalidades:

### **I. Observação do produto amplificado por PCR**

Após a realização da amplificação do ADN alvo por PCR foi necessário conferir se o material foi ou não amplificado. Este procedimento foi efetuado a seguir à PCR com recolha do produto da reação, juntamente com o controlo negativo (realizado em todas as amplificações juntamente com as amostras, de forma a confirmar a inexistência de contaminações), e subsequente eletroforese em gel de agarose a 2%.

### **II. Observação do produto produzido por digestão com enzimas de restrição (PCR-RFLP)**

Para a observação dos alelos gerados por cada um dos polimorfismos em estudo foi realizada uma eletroforese após a digestão com a enzima de restrição respetiva (Tabela 8). A eletroforese foi efetuada em gel de agarose a 2%, corado com brometo de etídio (0,2 mg/ml), e em gel de poliacrilamida a 10%. A observação de bandas no gel de poliacrilamida foi realizada através da coloração com nitrato de prata (*Silver-staining*). O procedimento foi realizado consoante as indicações de Budowle *et al.* (1991), podendo as mesmas serem observadas no anexo 2.

## **2.5 Sequenciação**

Após a realização da genotipagem realizou-se a sequenciação de algumas amostras através do método de Sanger (Sanger *et al.*, 1977) para confirmar os resultados obtidos com os métodos de genotipagem previamente descritos.

Procedeu-se à realização do protocolo de purificação (Tabela 9), no qual os restantes produtos amplificados foram purificados com um 1  $\mu\text{L}$  Exosap (USB, Cleveland, OH, USA) a 37°C durante 15 minutos e depois a 80°C durante 15 minutos. Depois da purificação da amostra foi realizada a sequenciação (Tabela 9), utilizando o *kit BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing* (Applied Biosystems), neste processo utilizou-se 6,5  $\mu\text{L}$  água bi-destilada, na qual se juntou o produto purificado, 1  $\mu\text{L}$  de BigDye e 0,5  $\mu\text{L}$  de *primer* (direto ou reverso, 100 ng/  $\mu\text{L}$ ). A solução foi inserida no termociclador, realizando 25 ciclos: 96°C (20 segundos) e 60°C (2 minutos).

**Tabela 9: Protocolo de Sequenciação**

Purificação				Sequenciação				
Protocolo de solução		Protocolo do Programa		Protocolo de solução		Protocolo do Programa		
Produto amplificado	4 $\mu\text{l}$	37°C	15 min.	Água bi-destilada	6,5 $\mu\text{l}$	96°C	20 seg.	25X
Exosap	1 $\mu\text{l}$	80°C	15 min.	Produto purificado	2,0 $\mu\text{l}$	60°C	2 min.	
		8°C	15 min.	Big Dye	1 $\mu\text{l}$	8°C		
				Primer (100 ng/ $\mu\text{l}$ )	0,5 $\mu\text{l}$			

**Abreviaturas:** seg: segundos; min: minutos.

## 2.6 Análise estatística

Para cada polimorfismo foram calculadas as frequências alélicas e genotípica e verificada se a sua proporção se encontra no Equilíbrio de Hardy-Weinberg. A associação estatística entre os polimorfismos e os níveis de HbF (após transformação logarítmica) foi analisada por regressão linear em modelo aditivo (o que assume que o genótipo heterozigótico representa um risco intermédio para a condição em relação aos dois genótipos homozigóticos). Foi calculado o coeficiente de regressão beta ( $\beta$ ) que representa o efeito de cada alelo *minor* sobre a variável dependente em estudo (níveis de HbF). Foi avaliada a influência dos haplótipos nos níveis de HbF combinando os dois polimorfismos localizados no *cluster* beta-globínico (*LCR-5'HS4* rs16912979 e *XmnI-*

*HBG2* rs7482144) e avaliado o efeito cumulativo dos alelos de risco (alelos *minor*) dos polimorfismos que foram encontrados significativamente associados a HbF.

O cálculo das frequências alélicas, o teste ao Equilíbrio de Hardy-Weinberg, a regressão linear (com cálculo dos parâmetros  $\beta$ , IC 95%: intervalo de confiança 95% e valores de  $p$ ) e a associação haplotípica foram realizados com recurso ao programa informático PLINK ([www.pngu.mgh-harvard.edu/purcell/plink](http://www.pngu.mgh-harvard.edu/purcell/plink)) (Purcell *et al.*, 2007).

A exploração de dados, o teste Mann-Whitney para comparação das médias de HbF entre genótipos, testes de qui-quadrado e elaboração dos gráficos, foram efetuados com o programa informático IBM SPSS Statistics – v20 (*Statistical Package for the Social Sciences*).



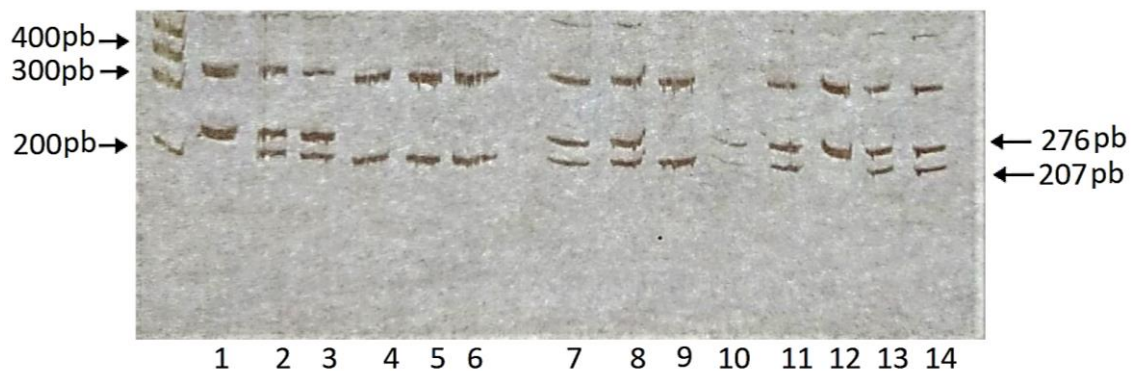


## 3. Resultados

### 3.1 Genotipagem

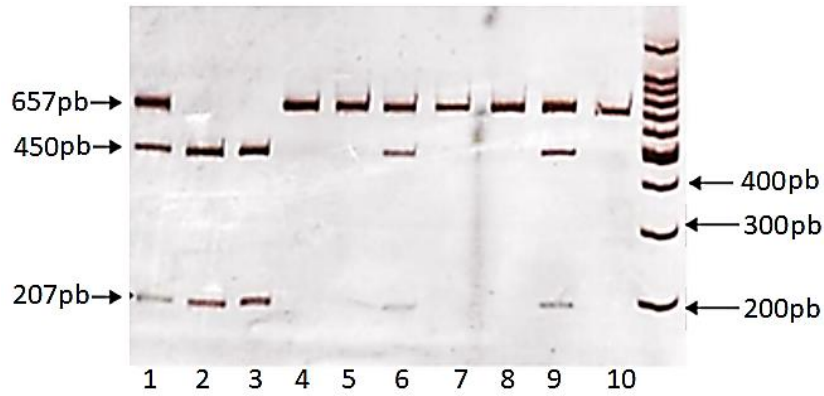
Nas figuras seguintes são mostradas as diferentes metodologias utilizadas neste trabalho onde podem ser observados os genótipos obtidos para alguns dos SNPs analisados.

Na Figura 6, é possível observar o padrão eletroforético obtido em gel de poliacrilamida dos fragmentos amplificados por PCR de forma a identificar a deleção de 3-pb do polimorfismo rs66650371 no locus *HMIP*. São mostrados os três genótipos homocigótico normal (sem deleção), homocigótico com deleção e heterocigótico normal/com deleção.



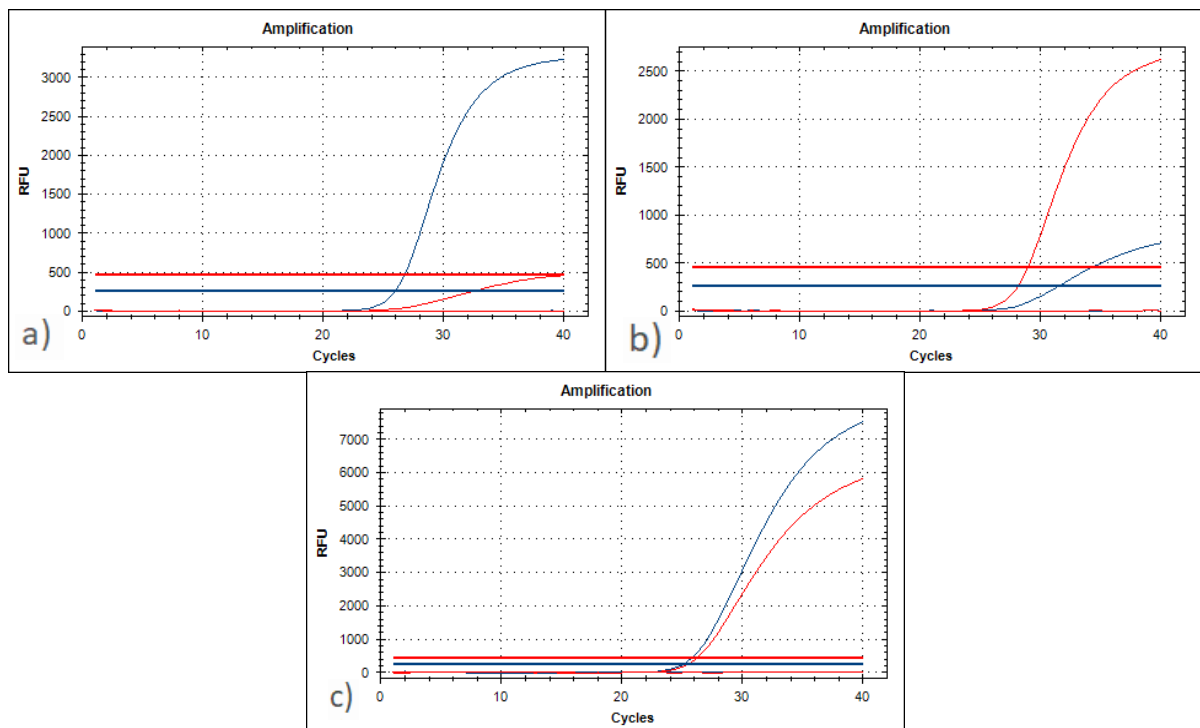
**Figura 6:** Genótipos obtidos para a deleção de 3-pb do SNP rs66650371 (*HMIP*) por eletroforese horizontal em gel de poliacrilamida. 1,12: indivíduos homocigóticos para a deleção; 2, 3, 7, 8, 10, 11, 13, 14: indivíduos heterocigóticos (alelo normal e alelo deleção); 4,5,6, 9: Indivíduos homocigóticos sem deleção.

Na Figura 7 é observável o padrão eletroforético em gel de poliacrilamida, da discriminação alélica para o polimorfismo rs7482144 do loci *HBG2*, após a digestão com a enzima de restrição *XmnI*. São mostrados os três genótipos C/C, C/T e T/T.



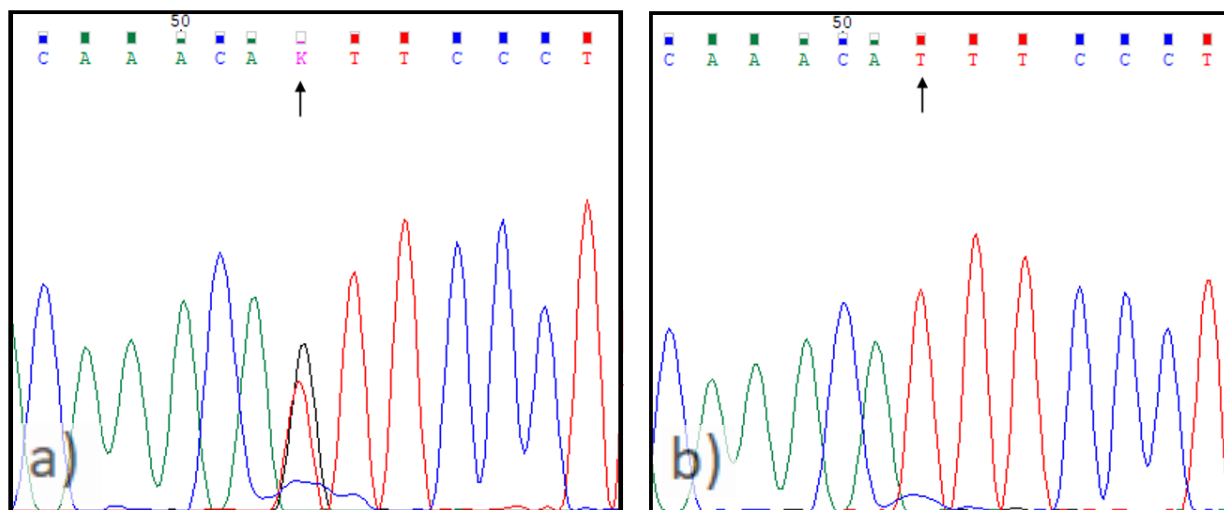
**Figura 7:** Genótipos obtidos para o polimorfismo *XmnI-HBG2* rs7482144 através da técnica RFLP, por eletroforese horizontal em gel de poliacrilamida. 1,6,9: indivíduos heterozigóticos (T/C); 2,3: indivíduos homozigóticos para o alelo derivado (T/T); 4,5,7,8,10: Indivíduos homozigóticos para alelo ancestral (C/C).

Na Figura 8, é possível observar os diferentes genótipos (C/C, C/T e T/T) obtidos através da utilização de sondas TaqMan por *real time-PCR*, para o polimorfismo rs11759328 (*ARHGAP18*). A discriminação alélica foi efetuada através da interpretação da intensidade da fluorescência do corante FAM e HEX, a linha azul representa o alelo *minor*, enquanto a linha vermelha representa o alelo *major*.



**Figura 8:** Genótipos obtidos para o polimorfismo rs11759328 (*ARHGAP18*) com recurso às sondas TaqMan em *real time-PCR*. a): genótipo homozigótico derivado (T/T); b): genótipo homozigótico ancestral (C/C); c): genótipo heterozigótico (C/T).

Na figura 9, são mostrados os genótipos heterozigótico G/T e homozigótico T/T visualizados através da sequenciação de Sanger, para o polimorfismo rs1427407 no locus BCL11A.



**Figura 9:** Genótipos obtidos para o polimorfismo *BCL11A* rs1427407, através da sequenciação de Sanger. a): genótipo heterozigótico (G/T); b): genótipo homozigótico para o alelo derivado (T/T).

### 3.2 Associação individual aos níveis de HbF

Na análise dos dados estatísticos referentes aos indivíduos com  $\beta$ -talassemia *minor*, a Tabela 10 mostra os resultados obtidos. Podem ser observadas as frequências alélicas para o alelo *minor* (MAF – *minor allele frequency*) na amostra em estudo, bem como os valores de MAF para populações europeias e africanas depositados na base Ensembl (<https://www.ensembl.org/>). A distribuição dos genótipos encontra-se no equilíbrio de Hardy-Weinberg na população em estudo para todos os polimorfismos analisados neste trabalho ( $p > 0,05$ ).

A associação dos polimorfismos aos níveis de HbF foi analisada por regressão linear, em modelo aditivo (Tabela 10). Não se verificaram valores de associação estatisticamente significativos para os polimorfismos nos genes *DCHS2* (rs61746132), *RNF113B* (rs16955011), *ARHGAP18* (rs11759328), *KLF1* (rs79334031) e *LCR-5'HS4* (rs16912979) (com valores  $p$  a variar entre 0,206 e 0,911). Por outro lado, verificaram-se valores  $p$  significativos na associação aos níveis de HbF para os polimorfismos *BCL11A* rs1427407 ( $p = 0,033$ ), *HMIP* rs66650371 ( $p = 0,004$ ) e *XmnI-HBG2* rs7482144 ( $p =$

0,004). Foram obtidos valores positivos de beta (0,20, 0,24 e 0,28, respectivamente) o que significa que são os alelos *minor* a influenciar o fenótipo. A variabilidade de HbF explicada por cada um destes polimorfismos foi de 12,5% para o SNP *HMIP* rs66650371, 12,4% para *XmnI-HBG2* rs7482144 e 6,9% para *BCL11A* rs1427407. A significância estatística manteve-se significativa utilizando a idade e o sexo como covariáveis (rs1427407,  $p = 0,016$ ; rs66650371,  $p = 0,006$ ; rs7482144,  $p = 0,005$ ).

**Tabela 10: Resultados da associação entre os SNPs em estudo e os níveis de HbF no grupo de indivíduos com  $\beta$ -talassemia *minor*.**

Chr: posição	Gene	SNP	Alelos (1:2)	MAF AFR#	MAF EUR#	N	MAF	P-HWE	Beta	SE	Variância (%)	P	P*
2: 60490908	BCL11A	rs1427407	T:G	0,24	0,15	66	0,174	0,092	0,200	0,092	6,87	<b>0,033</b>	<b>0,016</b>
4:154235260	DCHS2	rs61746132	A:G	0,14	0,01	66	0,038	1	-0,012	0,213	0,005	0,953	0,864
6: 129691228	ARHGAP18	rs11759328	T:C	0,08	0,19	66	0,174	0,392	-0,081	0,099	1,04	0,415	0,896
6: 135097495-497	HMP	rs66650371	Del:N	0,04	0,26	66	0,280	0,557	0,243	0,080	12,5	<b>0,004</b>	<b>0,006</b>
11: 5254939	HBG2	rs7482144	T:C	-	-	66	0,174	0,392	0,281	0,093	12,4	<b>0,004</b>	<b>0,005</b>
11: 5288465	LCR-5'HS4	rs16912979	G:A	0,52	0,19	66	0,246	1	0,146	0,090	4,03	0,109	0,206
13:98176963	RNF113B	rs16955011	T:C	0,19	0,07	66	0,106	0,537	0,076	0,126	0,56	0,549	0,486
19: 12887288	KLF1	rs79334031	A:G	-	0,04	66	0,053	1	0,139	0,182	0,91	0,445	0,480

**Abreviaturas:** N: número de amostra; Alelos: 1-*minor*, 2-*major*; MAF: frequência do alelo *minor*; p-HWE: valor-p obtido através do equilíbrio de Hardy-Weinberg; Beta: coeficiente de regressão; SE: Erro padrão;

P: valor-p obtido através da análise de regressão linear em modelo aditivo;

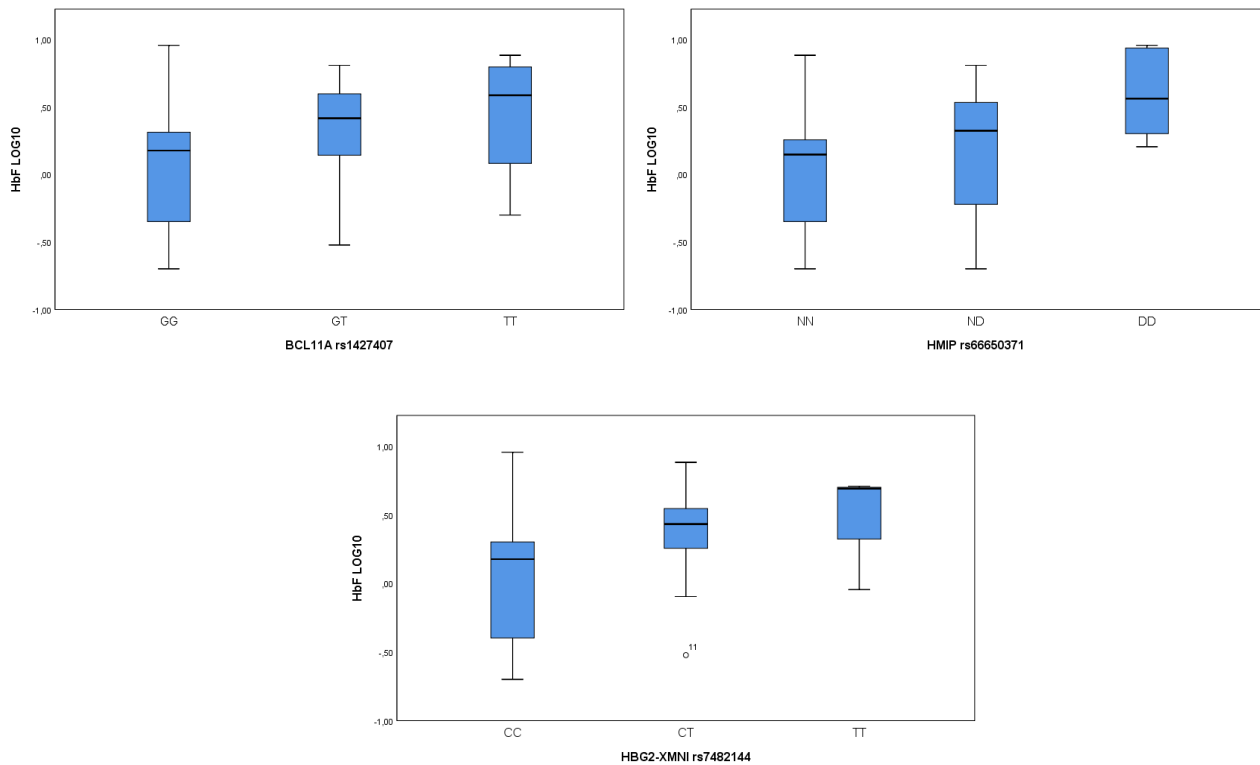
P\*: valor-p ajustado ao sexo e idade; Valores p significativos ( $p < 0,05$ ) a negrito;

Posição de cromossoma (Chr:posição) de acordo com o Ensembl;

# dados retirados do Ensembl

Na Figura 10 é possível observar os *Box-plots* da distribuição do nível de HbF (log-transformada) dos polimorfismos *BCL11A* (rs1427407), *HMIP* (rs66650371) e *XmnI-HBG2* (rs7482144) que obtiveram valores *p* significativos na associação com os níveis de HbF. É possível inferir pela observação dos *Box-plots* que a distribuição do nível de HbF tende a aumentar nos genótipos com o alelo derivado, verificando-se níveis mais elevados de HbF nos genótipos homocigóticos para o alelo *minor*.

Os *Box-plots* para os polimorfismos rs61746132 (*DCHS2*), rs16955011 (*RNF113B*), rs11759328 (*ARHGAP18*), rs79334031 (*KLF1*) e rs16912979 (*LCR-5'HS4*) para os quais não foram obtidos valores *p* significativos na associação com os níveis de HbF podem ser consultados no apêndice.



**Figura 10:** Box-plots da distribuição do nível de HbF (log-transformada) dos polimorfismos rs1427407 (*BCL11A*), rs66650371 (*HMIP*) e rs7482144 (*XmnI-HBG2*), tendo em conta os genótipos: homocigótico para o alelo ancestral; heterocigótico; homocigótico para o alelo derivado.

Se compararmos a média dos níveis de HbF entre os diferentes genótipos de cada SNP, agrupando os dois genótipos com o alelo *minor* de cada polimorfismo (Tabela 11), verificamos que para os polimorfismos localizados nos genes *DCHS2* (rs61746132), *RNF113B* (rs16955011), *ARHGAP18* (rs11759328), *KLF1* (rs79334031) e *LCR-5'HS4* (rs16912979) não foram obtidas diferenças estatisticamente significativas entre os níveis de HbF entre os dois grupos de genótipos (valores de *p* entre 0,198 e 0,808), em concordância com os resultados obtidos por regressão linear.

Por outro lado, para os polimorfismos *BCL11A* (rs1427407), *HMIP* (rs66650371), *HBG2* (rs7482144) foram obtidos valores de *p* significativos quando comparados os dois grupos de genótipos (Tabela 11), verificando-se valores de médias de HbF mais elevada no grupo dos genótipos heterozigóticos e homozigóticos para o alelo derivado.

**Tabela 11: Comparação da média dos níveis de HbF entre os diferentes genótipos de cada SNP no grupo de indivíduos com  $\beta$ -talassemia *minor*.**

<i>Loci</i>	SNP	Genótipos Média HbF (SE)		P
BCL11A	rs1427407	GG (n=47) 1,84 (0,28)	GT+TT (n=19) 3,05 (0,51)	<b>0,025</b>
DCHS2	rs61746132	GG (n=61) 2,23 (0,27)	GA (n=5) 1,66 (0,42)	0,808
ARHGAP18	rs11759328	CC (n=46) 2,17 (0,30)	CT+TT (n=20) 2,23 (0,48)	0,759
HMIP	rs66650371	NN (n=35) 1,58 (0,27)	ND+DD (n=31) 2,87 (0,42)	<b>0,009</b>
HBG2 (XmnI)	rs7482144	CC (n=46) 1,83 (0,31)	CT+TT (n=20) 3,02 (0,41)	<b>0,002</b>
LCR-5'HS4	rs16912979	AA (n=37) 1,95 (0,35)	AG+GG (n=28) 2,35 (0,35)	0,198
RNF113B	rs16955011	CC (n=53) 2,07 (0,62)	CT+TT (n=13) 2,67 (0,75)	0,513
KLF1	rs79334031	GG (n=59) 2,12 (0,26)	GA (n=7) 2,81 (1,10)	0,381

**Abreviaturas:** n: número de indivíduos da amostra para cada genótipo (genótipo homozigótico versus genótipos heterozigótico e homozigótico para o alelo derivado); SE: Erro padrão; N: sem deleção; D: com deleção; P: valor-*p* obtido através do teste Mann-Whitney; Valores *p* significativos (*p* < 0,05) a negrito; Os valores médios de HbF na tabela são não-transformados.

### 3.3 Associação haplotípica aos níveis de HbF

Foi feita a análise haplotípica dos dois polimorfismos *LCR-5'HS4* rs16912979 e *XmnI-HBG2* rs7482144 localizados no *cluster* beta-globínico (cromossoma 11), tendo sido obtidos três haplótipos (Tabela 12). O primeiro haplótipo (GT), combina ambos os alelos *minor* dos dois polimorfismos, e mostrou valores significativos de associação aos níveis de HbF ( $p = 0,0034$ ), explicando cerca de 13% da variabilidade de HbF ( $r^2 = 0,128$ ). Os restantes dois haplótipos (GC e AC), não mostraram valores significativos de associação aos níveis de HbF ( $p > 0,05$ ) (Tabela 12).

**Tabela 12: Frequência de haplótipos para os dois SNPs *LCR-5'HS4* rs16912979 e *XmnI-HBG2* rs7482144 no *cluster* da Beta-globina e sua associação aos níveis de HbF.**

SNPs	N	Haplótipo	Freq	Beta	R <sup>2</sup>	P
rs16912979 rs7482144	65	GT	0,169	0,284	0,128	<b>0,0034</b>
		GC	0,076	-0,269	0,047	0,082
		AC	0,746	-0,159	0,047	0,081

**Abreviaturas:** N: número de indivíduos da amostra para o haplótipo; Freq: frequência; Beta: coeficiente de regressão; R<sup>2</sup> variância das proporções explicada pelo modelo; P: valor-p obtido através da associação dos haplótipos; Valores  $p$  significativos ( $p < 0,05$ ) a negrito.

### 3.4 Efeito cumulativo dos alelos *minor* nos níveis de HbF

Na Tabela 13 é possível observar o resultado do efeito cumulativo dos alelos *minor* dos SNPs *BCL11A* rs1427407, *HMIP* rs66650371 e *XmnI-HBG2* rs7482144, que mostraram estar associados significativamente ao aumento de HbF. Considerando dois grupos de indivíduos, um grupo com HbF aumentada e um segundo grupo com HbF normal (assumindo um *cut off* de 1%), a amostra de indivíduos com 1 alelo de risco para o aumento de HbF mostra um valor de *odds ratio* (OR) de 4,25, com valor de  $p$  não significativo ( $p = 0,079$ ) na comparação com o grupo de indivíduos sem alelos *minor*. Por outro lado, a amostra de indivíduos com 2-3 alelos de risco mostra um aumento no valor de OR para 28,9, com um valor de  $p$  altamente significativo ( $p = 1,9e^{-5}$ ) quando comparada com a amostra de indivíduos sem alelos *minor*. Esta análise mostra que existe uma associação mais forte para HbF com o aumento do número de alelos *minor* dos *loci* considerados.



**Tabela 13: Análise do efeito cumulativo dos alelos associados ao aumento de HbF, para os três SNPs: *BCL11A* rs1427407, *HMIP* rs66650371 e *XmnI-HBG2* rs7482144.**

<b>Alelos de risco</b>	<b>N° Indivíduos HbF normal</b>	<b>N° Indivíduos HbF elevada</b>	<b>OR (95% CI)</b>	<b><math>\chi^2</math></b>	<b><i>P</i></b>
0	17	2	1 (Referência)		
1	16	8	4,25 (0,78 – 23,11)	3,09	0,079
2-3	5	17	28,9 (4,91 – 170,06)	18,27	<b>1,9e-5</b>

**Abreviaturas:** OR, *odds ratio*; CI: intervalo de confiança;  $\chi^2$ :qui-quadrado; P: valor-*p* obtido através da associação cumulativa dos alelos de risco; Valores *p* significativos (*p* <0,05) a negrito. HbF normal :<1; HbF elevada: >1.



## 4. Discussão

---

Na população mundial, a anemia falciforme e a  $\beta$ -talassemia são as desordens genéticas que representam a maior ameaça para a saúde pública. Estas patologias genéticas causadas por anomalias que afetam o gene  $\beta$ -globina carecem de solução no que diz respeito ao seu controlo e abordagens terapêuticas (Thein e Menzel, 2009; Costa *et al.*, 2016).

As talassemias compreendem um amplo espectro de fenótipos clínicos que variam desde o estado de portador silencioso a fenótipos agressivos que resultam na dependência de tratamentos e de transfusões sanguíneas. O fenótipo mais grave desses distúrbios é a talassemia *major*. Nesses casos a produção de cadeias  $\beta$ -globina é severamente afetada, o que leva a um desequilíbrio de produção entre as cadeias  $\alpha$  e  $\beta$  globina. A ausência de cadeias  $\beta$ -globina e a produção normal de cadeias  $\alpha$ -globina, leva a um excesso de cadeias  $\alpha$ , provocando a destruição celular prematura com eritropoiese ineficaz levando a quadros de anemias (Constanço *et al.*, 2011).

A síntese reduzida de cadeias  $\alpha$  e  $\beta$  globina é originada por mutações, as que afetam os genes  $\beta$ -globínico são classificadas maioritariamente como mutações pontuais enquanto que as mutações que afetam os genes  $\alpha$ -globínico são maioritariamente grandes deleções. Relativamente às mutações pontuais na população portuguesa que provocam  $\beta$ -talassemia as mais frequentes são: codão 39(C>T); ISVI-1 (G>A); IVSI-6 (T>C); IVSI-110 (G>A), embora com diferentes distribuições nas diferentes regiões do país (Ribeiro *et al.*, 1997; Constanço *et al.*, 2011)

Como já foi referido anteriormente o quadro clínico dos indivíduos que padecem de  $\beta$ -talassemia é bastante amplo. Nestes deve-se considerar o equilíbrio entre as cadeias alfa e beta, e que essas podem estar dependentes de outros mecanismos, nomeadamente a existência de polimorfismos genéticos que conferem a capacidade de aumentar a produção de cadeias  $\gamma$ -globina, de forma a que o desfalque de cadeias  $\beta$ -globina seja compensado. Assim os fenótipos são menos agressivos, gerando hemoglobinas mais funcionais, equilibrando o desequilíbrio subjacente relativo às cadeias alfa (Constanço *et al.*, 2011). Dessa forma as variações na expressão dos níveis de HbF relaciona-se com a redução da morbidade e mortalidade de patologias relacionadas com os distúrbios da hemoglobina (Platt *et al.* 1994; He *et al.* 2017).

Os níveis elevados de HbF na vida adulta não demonstram qualquer consequência em indivíduos saudáveis, contudo, em indivíduos com  $\beta$ -talassemia e anemia falciforme provocam a diminuição da severidade que essas patologias acarretam aos pacientes (Thein e Menzel, 2009; Wahlberg *et al.*, 2009; He *et al.*, 2017). A identificação dos genes e das variantes genéticas que contribuam para o aumento nos níveis de produção de HbF pode auxiliar no desenvolvimento de novas formas terapêuticas, já que o conhecimento e compreensão dos mecanismos moleculares subjacentes à expressão de  $\gamma$ -globina poderá promover a sua reativação (Thein e Menzel, 2009; He *et al.*, 2017). Foram até agora identificados três *loci* principais associados à regulação da expressão de HbF, nomeadamente o polimorfismo *XmnI-HBG2* (rs782144), e diversos polimorfismos na região intergênica *HBSIL-MYB* (*HMIP*) e no gene *BCL11A* (Farrell *et al.*, 2011; Jawaid *et al.*, 2010; He *et al.*, 2017; Thein, 2017).

No presente trabalho foi feito um estudo de replicação dos resultados de associação aos níveis de HbF previamente encontrados noutras populações para três SNPs localizados nestes *loci* principais, numa amostra de indivíduos portadores de  $\beta$ -talassemia *minor* de naturalidade portuguesa. Por outro lado, tentámos identificar variantes localizadas noutras regiões do genoma associadas a HbF. Contudo, apenas obtivemos significância estatística para os três polimorfismos localizados nos genes *BCL11A*, *HMIP* e *HBG2*, os principais QTL associados aos níveis de HbF.

Relativamente ao gene *BCL11A* localizado no cromossoma 2p16, codifica um fator de transcrição que se liga a regiões do *cluster HBB*, atuando como um importante repressor da produção de globinas gama (Thein 2017). O *knockdown* do gene *BCL11A* foi associado a um elevado aumento de HbF (Jawaid *et al.*, 2010). Determinadas variantes localizadas no segundo intrão do gene *BCL11A* foram associadas à redução modesta da expressão de *BCL11A* e, conseqüentemente, a uma expressão aumentada de HbF. Possivelmente os diversos SNPs atuam em conjunto para influenciar a regulação de *BCL11A*, influenciando os níveis de HbF (Bauer *et al.*, 2013).

Neste trabalho investigou-se o SNP rs1427407, localizado no intrão 2 do gene *BCL11A*, tendo-se encontrado uma associação significativa aos níveis de HbF para o alelo *minor* T ( $p = 0,033$ ). Este resultado vai ao encontro de um outro estudo realizado em indivíduos caucasianos europeus saudáveis, no qual o polimorfismo rs1427407 obteve

valores significativos na associação com o aumento de HbF ( $p = 6,1e^{-31}$ ) (Menzel *et al.*, 2007).

A associação do gene *BCL11A*, nomeadamente o polimorfismo rs1427407, com os níveis de HbF foi comprovada também em diferentes populações com  $\beta$ -talassemia e anemia falciforme. Em pacientes com  $\beta$ -talassemia, a associação de HbF é observada na população chinesa ( $p = 0,003$ ) (Chan *et al.*, 2016) e iraquiana ( $p = 0,0005$ ) (Al-Allawi *et al.*, 2018). O mesmo resultado foi possível de observar para a anemia falciforme, em indivíduos indianos ( $p = 0,017$ ) (Bhanushali *et al.*, 2015); na população africana ( $p = 7,23e^{-50}$ ) (Bauer *et al.*, 2013); e na população nigeriana ( $p = 7e^{-10}$ ) (Adeyemo *et al.*, 2018).

No que concerne à população portuguesa outro estudo constatou a influência de outros polimorfismos do gene *BCL11A* nos níveis de HbF em indivíduos com  $\beta$ -talassemia *minor*. Pereira *et al.* (2015), analisaram os SNPs rs11886868 e rs766432 do gene *BCL11A*, obtendo valores significativos de associação para o SNP rs766432 ( $p = 0,001$ ). Assim na população portuguesa podemos inferir a existência de dois polimorfismos no gene *BCL11A* relacionado com o aumento de HbF em indivíduos com  $\beta$ -talassemia *minor*, os SNPs rs766432 e rs1427407.

Através de estudos de associação genética foi identificada uma região intergénica *HBS1L-MYB* (HMIP) no cromossoma 6q23 associada à variação de HbF. Jiang e colaboradores (2006), através da análise de culturas eritróides associaram os níveis elevados de HbF com a expressão reduzida dos genes *MYB* e *HBS1L*. Demonstraram que o gene *MYB* é um fator chave para a produção de HbF relacionando-se com os genes da globina através do controlo dos ciclos celulares (Jiang *et al.*, 2006). A sua supressão aumenta a HbF através da aceleração da maturação das células eritróides (sem supressão da medula). Estudos funcionais mostraram que os SNPs localizados nesta região intergénica *HMIP* desregulam a ligação de factores eritróides essenciais, afetando interações cromossómicas com o gene *MYB* o que afeta a sua expressão (Thein, 2017).

Num estudo realizado por Farrell e colaboradores (2011) em indivíduos chineses com  $\beta$ -talassemia *minor* (heterozigóticos), o SNP *HMIP* rs9399137 mostrou forte associação com os níveis elevados de HbF ( $p = 1.39e^{-24}$ ). Neste estudo foi também identificada uma deleção de 3 pares de bases (del 3-pb) (TAC) na região Chr6: 135460326 - 135460328 (rs66650371) em completo desequilíbrio de ligação com o SNP rs9399137 em indivíduos chineses, europeus e africanos (Farrell *et al.*, 2011). Essa deleção tornou-se o

polimorfismo *HMIP* mais analisado nos estudos de associação com HbF em diferentes trabalhos. Ambos os polimorfismos mostraram uma associação aos níveis de HbF com um valor de  $p$  idêntico ( $p = 1e^{-20}$ ). Os indivíduos que possuíam a TAC intacta na sua sequência de nucleótidos apresentavam valores de HbF de  $0,85\% \pm 0,70\%$ , enquanto os indivíduos homozigóticos para a del 3-bp apresentavam níveis de HbF  $3,24\% \pm 2,09\%$  (Farrell *et al.*, 2011).

Esta variante *HMIP* del 3-pb rs66650371 foi analisada no presente estudo tendo também mostrado estar associada aos níveis de HbF na amostra de indivíduos com  $\beta$ -talassemia *minor* na população portuguesa ( $p = 0,004$ ) à semelhança dos resultados obtidos por Farrel *et al.* (2011) numa amostra de indivíduos chineses com  $\beta$ -talassemia *minor*.

Resultados semelhantes foram obtidos noutros estudos efetuados para a região intergénica *HMIP*. Danjou e colaboradores (2015), examinaram as variantes na região intergénica *HBSIL-MYB* numa amostra da população geral da Sardenha, a variante rs66650371 obteve valor estatisticamente significativo, sendo a deleção (TAC) a influenciar ambas as formas de hemoglobina (HbF/HbA2) ( $p = 1.0e^{-82}$ ) (Danjou *et al.*, 2015). Outros trabalhos atestaram a influência desse polimorfismo, nomeadamente num grupo populacional de indivíduos nigerianos com anemia falciforme ( $p = 0,002$ ) (Adeyemo *et al.*, 2018).

A variante *XmnI-HBG2* (rs782144) localizada no cluster do gene  $\beta$ -globina no cromossoma 11p, foi o primeiro QTL identificado associado aos níveis de HbF em diversas populações em indivíduos africanos com anemia falciforme, sendo correntemente utilizado em estudos clínicos (Lai *et al.*, 2017; Thein, 2017). A associação aos níveis de HbF para o alelo *minor* rs782144-T foi também verificada no presente trabalho na amostra de indivíduos com  $\beta$ -talassemia *minor* de origem portuguesa ( $p = 0,004$ ). Tendo também sido constatada noutros grupos populacionais em indivíduos com  $\beta$ -talassemia, nomeadamente em chineses ( $p = 0,003$ ) (Chan *et al.*, 2016), indonésios ( $p = 2.52 e^{-19}$ ) (Nuinoon *et al.*, 2010) e curdos ( $p = 0.032$ ) (Albarawi *et al.*, 2018).

A presença deste polimorfismo varia consoante a distribuição geográfica (Ali *et al.*, 2015; Gawharya *et al.*, 2018), contudo nas populações em que a sua frequência é baixa ainda existe correlação com os níveis aumentados de HbF. Como é o caso de indivíduos egípcios com  $\beta$ -talassemia *major*, a presença desse polimorfismo levou ao aumento de

HbF ( $p < 0,05$ ) (Gawharya *et al.*, 2018). O mesmo foi observado na população paquistanesa, na qual, a resposta à terapia com hidroxiureia em indivíduos com  $\beta$ -talassemia tem sido associada a um efeito mais favorável na presença do polimorfismo *XmnI* (Ali *et al.*, 2015).

Em relação ao polimorfismo rs16912979, localizado também no cluster beta-globínico, na região *LCR-5'HS4*, não revelou associação significativa com os níveis de HbF na amostra estudada neste trabalho ( $p = 0,109$ ). Contrariamente, outros estudos sugerem uma associação entre a região *LCR-5'HS4* e os níveis de HbF noutras populações (Neishabury *et al.*, 2011; Habara, *et al.*, 2017; Vathipadiekal *et al.*, 2017). No estudo realizado por Neishabury e colaboradores (2012) em pacientes com  $\beta$ -talassemia, os indivíduos apresentavam um fenótipo clinicamente menos nocivo daquilo que seria esperado para o tipo de mutação existente na coorte de estudo. Assim, identificaram a existência da associação do genótipo GG com a melhoria do fenótipo dos distúrbios da talassemia, juntamente com o polimorfismo *XmnI-HBG2* ( $p = 0,003$ ). Essa associação entre o alelo G da região *LCR-5'HS4* e os fenótipos de  $\beta$ -talassemia tem sido investigada (Kukreti *et al.*, 2002; Neishabury *et al.*, 2011; Neishabury *et al.*, 2012), surgindo como possível local capaz de modificar o fenótipo associado as talassemias (Neishabury *et al.*, 2011; Neishabury *et al.*, 2012).

Na análise haplotípica dos dois polimorfismos *LCR-5'HS4* rs16912979 e *XmnI-HBG2* rs7482144, localizados no cromossoma 11, foi possível observar associação significativa com os níveis de HbF para o haplótipo que combina ambos os alelos *minor*: o haplótipo (GT) associa-se positivamente ao aumento de HbF ( $p = 0,0034$ ) explicando cerca de 13% da variabilidade de HbF ( $r^2 = 0,128$ ). Os restantes dois haplótipos (GC e AC) não mostraram associação com os níveis de HbF ( $p > 0,05$ ).

O estudo do efeito cumulativo dos alelos *minor* dos SNPs *BCL11A* rs1427407, *HMIP* rs66650371 e *XmnI-HBG2* rs7482144 encontrados associados significativamente ao aumento de HbF mostrou que existe um aumento na força de associação com o aumento do número de alelos *minor*, em concordância com o descrito na literatura (Lai *et al.*, 2017; Al-Allawi *et al.*, 2018). Quando comparadas com a amostra de indivíduos sem alelos *minor*, a amostra de indivíduos com 1 alelo *minor* mostra um valor de  $p$  não significativo ( $p = 0,08$ ) e a amostra de indivíduos com 2 ou 3 alelos *minor* mostra um valor de  $p$  altamente significativo ( $p = 1,9e^{-5}$ ).

Como já foi referido, o efeito cumulativo foi comprovado noutros estudos, nomeadamente, na investigação realizada por Lai e colaboradores (2017), em chineses com  $\beta$ -talassemia intermédia, no qual foi possível verificar que a presença dos genótipos de risco das variantes *HBG2* rs7482144, *HMIP* rs28384513, *HMIP* rs4895441 e *BCL11A* rs4671393 num indivíduo leva a um aumento nos níveis de HbF. Os indivíduos chineses com  $\beta$ -talassemia intermédia com a combinação de 1, 2 ou 3 alelos de risco teriam um aumento gradual dos níveis de HbF, ( $p = 0,067$ ;  $0,037$ ;  $0,002$  e  $OR = 1,498$ ;  $1,792$ ;  $8,361$ , respetivamente) em comparação com indivíduos sem a presença de alelo de risco (Lai *et al.*, 2017). Igualmente, foi realizada a mesma constatação na investigação de Al- Allawi e colaboradores (2018), na qual foi verificado o efeito cumulativo dos alelos *minor* nos SNPs *HBG2* rs7482144, *BCL11A* rs1427407 e *HMIP* rs9399137 no aumento de HbF ( $p < 0,0005$ ), demonstrando que os portadores dos alelos *minor* de cada um desses SNPs tinham a HbF significativamente mais elevada.

Relativamente aos restantes polimorfismos estudados no presente trabalho, os polimorfismos *DCHS2* rs61746132 e *RNF113B* rs16955011 não mostraram associação com os níveis de HbF ( $p = 0,953$  e  $p = 0,549$ , respetivamente). As investigações realizadas nestes genes por Sheehan *et al.* (2014) em doentes com anemia falciforme relacionavam a interação destas variantes com o tratamento por hidroxiureia, de forma a ser possível a estimulação de produção de HbF. Sheehan e colaboradores (2014) obtiveram valores estatisticamente significativos na associação desses polimorfismos com o aumento dos níveis de HbF, em resposta à hidroxiureia (*DCHS2* rs61746132  $p = 1,73e^{-4}$ ; e *RNF113B* rs16955011  $p = 3,76e^{-4}$ ). Devido a esta resposta eficaz ao tratamento com hidroxiureia, poderia esperar-se que estes genes pudessem mostrar associação aos níveis de HbF, contudo, isso não foi comprovado na amostra populacional analisada neste estudo.

No que concerne ao polimorfismo *ARHGAP18* rs11759328, o valor de  $p$  obtido (0,415) também mostrou que não existe associação com os níveis de HbF na amostra estudada neste trabalho. Assim, este resultado não reproduz o que foi observado por He e colaboradores (2017) na população chinesa, onde obtiveram associação significativa ( $p = 5.1e^{-4}$ ) entre o polimorfismo rs11759328 e os níveis de HbF em indivíduos com  $\beta$ -talassemia.

Relativamente ao polimorfismo rs79334031 (-148 C/T), localizado na região promotora do gene *KLF1*, não foi obtida associação significativa com HbF ( $p = 0,445$ ),



à semelhança do estudo efetuado por Pereira e colaboradores (2015) para o polimorfismo rs3817621 (-251G/C), também localizado na região promotora do gene *KLF1*, em amostras de indivíduos com  $\beta$ -talassemia *minor* ( $p = 0,079$ ) e com parâmetros hematológicos normais ( $p = 0,134$ ). Este resultado não está de acordo com outras investigações, que identificaram uma correlação entre a variante -148 C/T no gene *KLF1* e o aumento dos níveis de HbF (Radmilovic *et al.*, 2012). Por outro lado, diversas mutações na região codificante do gene *KLF1* têm sido apontadas como causa de aumento dos níveis de HbF em doentes com hemoglobinopatias (Gallienne *et al.*, 2012)



## 5. Conclusão

---

A relação entre os níveis de HbF e a melhoria dos sintomas clínicos tem sido verificada em doentes com  $\beta$ -talassemia e anemia falciforme. Investigações recentes focaram-se na identificação de variantes genéticas responsáveis pela regulação da expressão dos níveis de HbF, procurando novos alvos terapêuticos para o tratamento de distúrbios da hemoglobina, nomeadamente, as síndromes falciformes e as talassemias.

Na literatura estão identificados os três *loci* de características quantitativas (QTL) principais associados à variabilidade de HbF, sendo eles o cluster *HBB*, a região intergénica *HBS1L-MYB* e o gene *BCL11A*. Diversos polimorfismos genéticos localizados nesses *loci* foram associados com a expressão elevada de HbF em doentes com formas graves de  $\beta$ -talassemias e com anemia falciforme, bem como em indivíduos saudáveis ou portadores com  $\beta$ -talassemia *minor* de diferentes populações. Essa associação com HbF foi possível de replicar para os polimorfismos *BCL11A* rs1427407, *HMIP* rs66650371 e *XmnI-HBG2* rs7482144 na amostra de indivíduos com  $\beta$ -talassemia *minor* utilizada neste trabalho ( $p = 0,016$ ,  $p = 0,006$ ,  $p = 0,005$ , respetivamente). Foram analisadas outras variantes genéticas potencialmente influenciadores dos níveis de HbF, nomeadamente os polimorfismos nos genes *DCHS2* (rs61746132), *RNF113B* (rs16955011), *ARHGAP18* (rs11759328), *KLF1* (rs79334031) e *LCR-5'HS4* (rs16912979), contudo a associação com os níveis aumentados de HbF não foi verificada ( $p > 0,005$ ).

Estes resultados obtidos na população portuguesa estão de acordo com o que tem sido descrito na literatura, com muitos estudos genéticos a caracterizar algumas variantes envolvidas na regulação da HbF nos três QTL *BCL11A*, *HMIP* e cluster *HBB*. Considerando que a reativação da expressão do gene *HBG2* com a consequente aumento dos níveis de HbF traria benefícios clínicos importantes para doentes com  $\beta$ -talassemia ou anemia falciforme, a identificação de *loci* e vias bioquímicas associados a HbF poderá vir a proporcionar novos alvos terapêuticos tirando vantagem dos novos conhecimentos sobre a fisiopatologia destas doenças, bem como do desenvolvimento das novas tecnologias genéticas.



## 6. Referências

---

Adeyemo, T. A.; Ojewunmi, O. O.; Oyetunji, I. A.; Rooks, H.; Rees, D. C.; Akinsulie, A. O.; Akanmu, A. S.; Thein, S. L.; Menzel, S. 2018. A survey of genetic fetal-haemoglobin modifiers in Nigerian patients with sickle cell anaemia. *PLOS ONE*, 13(6): 1-10. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0197927>

Al-Allawi, N.; Qadir, S. M. A.; Puehringer, H.; Chui, D. H. K.; Farrell, J. J.; Oberkanins, C. 2018. The association of HBG2, BCL11A, and HMIP polymorphisms with fetal hemoglobin and clinical phenotype in Iraqi Kurds with sickle cell disease. *International Journal Laboratory Hematology*, 41:87–93. DOI:10.1111/ijlh.12927.

Ali, N.; Ayyub, M.; Khan, S. A.; Ahmed, S.; Abbas, K.; Malik, H. S.; Tashfeen, S. 2015. Frequency of Gγ-globin promoter –158 (C>T) XmnI polymorphism in patients with homozygous/compound heterozygous beta thalassaemia. *Hematology/Oncology and Stem Cell Therapy*, 8: 10-15. DOI:10.1016 / j.hemonc.2014.12.004.

Basak, A.; Sankaran, V. G. 2016. Regulation of the fetal hemoglobin silencing factor BCL11A. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1368(1): 25–30. DOI:10.1111/nyas.13024.

Bauer, D. E.; Kamran, S. C.; Lessard, S.; Xu, J.; Fujiwara, Y.; Lin, C.; Shao Z.; Canver, M. C.; Smith, E. C.; Pinello, .; Sabo, P. J.; Vierstra, J.; Voit, R. A.; Yuan, G. C.; Porteus, M. H.; Stamatoyannopoulos, J. A.; Lettre, G.; Orkin, S. H. 2013. An erythroid enhancer of BCL11A subject to genetic variation determines fetal hemoglobin level. *Science (New York, N.Y.)*, 342(6155): 253–257. DOI:10.1126/science.1242088.

Bhanushali, A. A.; Patra, P. K.; Nair, D.; Verma, H.; Das, B. R. 2015. Genetic variant in the BCL11A (rs1427407), but not HBS1-MYB (rs6934903) loci associate with fetal hemoglobin levels in Indian sickle cell disease patients. *Blood Cells Molecular Disease*, 54: 4-8. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bcmed.2014.10.003>.

Borg, J.; Papadopoulos, P.; Georgitsi, M.; Gutiérrez, L.; Grech, G.; Fanis, P.; Phylactides, M.; Verkerk, A. J.; van der Spek, P. J.; Scerri, C. A.; Cassar, W.; Galdies, R.; van Ijcken, W.; Ozgür, Z.; Gillemans, N.; Hou, J.; Bugeja, M.; Grosveld, F. G.; von Lindern, M.; Felice, A. E.; Patrinos, G. P.; Philipsen, S. 2010. Haploinsufficiency for the

erythroid transcription factor KLF1 causes hereditary persistence of fetal hemoglobin. *Nature genetics*, 42(9): 801-805. DOI:10.1038/ng.630.

Budowle, B.; Chakraborty, R.; Giusti, A.; Eisenberg, A. Allen, R. 1991. Analysis of the VNTR locus D1S80 by the PCR followed by high resolution PAGE. *American Journal of Human Genetics*, 48: 137-144.

Cao, A.; Kan, Y. W. 2013. The prevention of thalassemia. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 3(2): 1-15. DOI:10.1101/cshperspect.a011775.

Carlice-dos-Reis, T.; Viana, J.; Moreira, F. C.; Cardoso, G. L.; Guerreiro, J.; Santos, S.; Ribeiro-dos-Santos, A. 2017. Investigation of mutations in the *HBB* gene using the 1,000 genomes database. *PLOS ONE*, 12 (4): 1-9. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174637>.

Chan, N. C.N.; Lau, K. L.; Cheng, K. C. K.; Chan, N. P.H.; Ng, M. H.L. 2016. A Multi-locus Approach to Characterization of Major Quantitative Trait Loci Influencing Hb F Regulation in Chinese  $\beta$ -thalassemia Carriers. *Hemoglobin*, 40(6): 400-404. DOI:10.1080/03630269.2016.1245198.

Chen, H.; Lowrey, C. H.; Stamatoyannopoulos, G. 1997. Analysis of enhancer function of the HS-40 core sequence of the human alpha-globin cluster. *Nucleic acids research*, 25(14): 2917-22.

Constanço, M. C.; Rocha, P.; Bento, C.; Silva, H. M. 2011. Talassemia  $\beta$  heterozigótica com triplicação do gene. *Acta Médica Portuguesa*, 24: 633-636.

Corrêa, E. M.; Possík, P. A. 2012. A análise de DNA por eletroforese. In: Naoum P. C. (Org.). *Eletroforeses- Hemoglobinopatias, proteínas séricas, lipoproteínas e DNA*. São Paulo-SP: Livraria Santos Editora, 283-290.

Costa, S. N.; Madeira, S.; Sobral, M. A.; Delgadinho, G. 2016. Hemoglobinopatias em Portugal e a intervenção do médico de família. *Revista Portuguesa de Medicina Geral e Familiar*, 32:416-24. Disponível em: <http://www.scielo.mec.pt/pdf/rpmgf/v32n6/v32n6a09.pdf>.

Crawford, M. H. 2007. Foundations of Anthropological Genetics, *In*: Crawford, M. H. (ed). *Anthropological Genetics Theory, Methods and Applications*. Cambridge University Press.

Danjou, F.; Zoledziewska, M.; Sidore, C.; Steri, M.; Busonero, F.; Maschio, A.; Mulas, A.; Perseu, L.; Barella, S.; Porcu, E.; Pistis, G.; Pitzalis, M.; Pala, M.; Menzel, S.; Metrustry, S.; Spector, T. D.; Leoni, L.; Angius, A.; Uda, M.; Moi, P.; Thein, S. L.; Galanello, R.; Abecasis, G. R.; Schlessinger, D. 2015. Genome-wide association analyses based on whole-genome sequencing in Sardinia provide insights into regulation of hemoglobin levels. *Nature Genetics*, 47(11): 1264–1271. DOI:10.1038/ng.3307.

Farrell, J.J.; Sherva, R. M.; Chen, Z.; Luo, H., Chu, B. F.; Ha, S. Y.; Li, C. K.; Lee, A. C. W.; Li, R. C. H., Li, C. K.; Yuen, H. L.; So, J. C.; Ma, E. S.; Chan, L. C.; Chan, V.; Sebastiani, P.; Farrer, L. A.; Baldwin, C. T.; Steinberg, M. H.; Chui, D. H. 2011. A 3-bp deletion in the *HBSII-MYB* intergenic region of chromosome 6q23 is associated with HbF expression. *Blood*, 117: 4935–4945. DOI:10.1182 / blood-2010-11-317081.

Gallienne, A. E.; Dréau, H. M.; Schuh, A.; Old, J. M.; Henderson, S. 2012. Ten novel mutations in the erythroid transcription factor KLF1 gene associated with increased fetal hemoglobin levels in adults. *Hematological*, 97(3): 340–343. DOI:10.3324/haematol.2011.055442.

Gawharya, S. E.; Farid, M.; Ezzata, M.; ElAwady, H.; Mostafa, H. 2018. XmnI polymorphism in Egyptian patients with  $\beta$ -thalassemia major and its correlation with the HbF level. *Gene Reports*, 11: 69-73. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.genrep.2018.02.005>.

Griffiths *et al* 2000. Hemoglobin - Quaternary Structure [Internet]. *Department Of Biology - Memorial University*. Disponível em: <http://www.mun.ca/biology/scarr/Gr09-07d.html>.

Habara, A. H.; Shaikho, E. M.; Steinberg, M. H. (2017). Fetal hemoglobin in sickle cell anemia: The Arab-Indian haplotype and new therapeutic agents. *American journal of hematology*, 92(11): 1233–1242. DOI:10.1002/ajh.24872.

Hardison R. C. 2012. Evolution of hemoglobin and its genes. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 2(12): 1-18. DOI:10.1101/cshperspect.a011627.

He, Y.; Luo, J.; Chen, Y.; Zhou, X.; Yu, S.; Jin, L.; Xiao, X.; Jia, S.; Liu, Q. 2018. ARHGAP18 is a novel gene under positive natural selection that influences HbF levels in  $\beta$ -thalassemia. *Molecular Genetics and Genomics*, 293(1): 207-216. DOI 10.1007/s00438-017-1377-2.

Higgs, D. R.; Forget, B. G. 2009. THE MOLECULAR, CELLULAR, AND GENETIC BASIS OF HEMOGLOBIN DISORDERS. In: Steinberg, M.; Forget, B.; Higgs, D.; Weatherall, D. (eds.). *Disorders of Hemoglobin: Genetics, Pathophysiology, and Clinical Management*. Cambridge University Press.

Ithamap. 2019. Disponível em: <https://www.ithanet.eu/>.

Ithanet. 2019. Disponível em: <https://www.ithanet.eu/>.

Jawaid, K.; Wahlberg, K.; Thein, S. L.; Best, S. 2010. Binding patterns of BCL11A in the globin and GATA1 loci and characterization of the BCL11A fetal hemoglobin locus. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 45 (15): 140-146. DOI:10.1016/j.bcmd.2010.05.006.

Jiang, J.; Best, S.; Menzel, S.; Silver, N.; Lai, M. I.; Surdulescu, G. L.; Spector, T. D.; Thein, S. L. 2006. cMYB is involved in the regulation of fetal hemoglobin production in adults. *Blood*, 108(3): 1077-1083. Disponível em: <https://doi.org/10.1182/blood-2006-01-008912>.

Jouini, L.; Bibi, A.; Ouali, F.; Hadj Fredj, S.; Ouennich, F.; Siala, H.; Messaoud, T.; Fattoum, S. 2011. Contribution of  $\beta$ -globin cluster polymorphisms to raise fetal hemoglobin levels in normal adults. *Molecular Biology Reports*, 39(4):4619–4625. DOI: 10.1007/s11033-011-1253-9.

Kukreti R. B-Rao, C.; Das, S.K.; De, M.; Talukder, G.; Vaz, F.; Verma, I.C.; Brahmachari, S.K. 2002. Study of the single nucleotide polymorphism (SNP) at the palindromic sequence of hypersensitive site (HS)4 of the human beta-globin locus control region (LCR) in Indian population. *American journal of hematology*, 69: 77-79.

Kaufman, D.P.; Lappin, S.L. 2019. Physiology, Fetal Hemoglobin. In: *StatPearls* [Internet]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK500011/>.

Lai, Y.; Zhou, L.; Yi, S.; Chen, Y.; Tang, Y.; Yi, S.; Yang, Z.; Wei, H.; Zheng, C.; He, S. 2017. The association between four SNPs (rs7482144, rs4671393, rs28384513 and



rs4895441) and fetal hemoglobin levels in Chinese Zhuang  $\beta$ -thalassemia intermedia patients. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 63: 52-57. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bcmd.2017.01.011>.

Lette, G. 2012. The search for genetic modifiers of disease severity in the  $\beta$ -hemoglobinopathies. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 2(10): 1-12. DOI:10.1101/cshperspect.a015032.

Lin, M.; Yang, L. Y.; Xie, D. D.; Chen, J. T.; Nguba, S. M.; Ehapo, C. S.; Zhan, X. F.; Eyi, J. U.; Matesa, R. A.; Obono, M. M.; Yang, H.; Yang, H. T.; Cheng, J. D. 2015. G6PD Deficiency and Hemoglobinopathies: Molecular Epidemiological Characteristics and Healthy Effects on Malaria Endemic Bioko Island, Equatorial Guinea. *Plos one*, 10(4):1-10. DOI:10.1371/journal.pone.0123991.

Lu, Y.; Goldstein, D. B.; Angrist, M.; Cavalleri, G. 2014. Personalized Medicine and Human Genetic Diversity. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 4 (9): 1-11. DOI:10.1101/cshperspect.a008581.

McGann, P.T.; Nero A.C.; Ware, R. E. 2017. Clinical Features of  $\beta$ -Thalassemia and Sickle Cell Disease *In*: Malik, P.; Tisdale, J. (eds). *Gene and Cell Therapies for Beta-Globinopathies*. Springer, New York, NY: 1-26.

Menzel, S.; Garner, S.; Gut, I.; Matsuda, F.; Yamaguchi, M.; Heath, S.; Foglio, M.; Zelenika, D.; Boland, A.; Rooks, H.; Best, S.; Spector, T. D.; Farrall, M.; Lathrop, M.; Thein, S. L. 2007. A QTL influencing F cell production maps to a gene encoding a zinc-finger protein on chromosome 2p15. *Nature Genetics*, 39:1197–1199. DOI:10.1038 / ng2108.

Modell, B.; Darlison, M. 2008. Global epidemiology of hemoglobin disorders and derived service indicators. *Bulletin of the World Health Organization*, 86(8):480–487. DOI:10.2471 / BLT.06.036673.

Moleirinho, A.; Seixas, S.; Lopes, A. M.; Bento, C.; Prata, M. J.; Amorim, A. 2013. Evolutionary Constraints in the  $\beta$ -Globin Cluster: The Signature of Purifying Selection at the  $\delta$ -Globin (HBD) Locus and Its Role in Developmental Gene Regulation. *Genome Biology and Evolution*, 5(3), 1559-571. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/gbe/evt029>.

Neishabury, M.; Azarkeivan, A.; Oberkanins, C.; Abedini, S. S.; Zamani, S.; Najmabadi, H. 2011. Analyzing 5'HS3 and 5'HS4 LCR core regions and NF-E2 in Iranian thalassemia intermedia patients with normal or carrier status for beta-globin mutations. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 46: 201-205. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bcmd.2010.12.007>.

Neishabury, M.; Zamani, S.; Azarkeivan, A.; Abedini, S.S.; Darvish, H.; Zamani, F.; Najmabadi, H. 2012. The modifying effect of Xmn1-HBG2 on thalassemic phenotype is associated with its linked elements in the beta globin locus control region, including the palindromic site at 5'HS4. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 46: 1-5. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bcmd.2011.10.001>.

Neto, G. C. G; Pitombeira, M. S. 2002. Aspectos moleculares da anemia falciforme. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*. 39: 51-56. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/jbpml/v39n1/v39n1a10>.

Nienhuis, A. W.; Nathan, D. G. 2012. Pathophysiology and Clinical Manifestations of the  $\beta$ -Thalasseмииs. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 2(12): 1-13. DOI:10.1101/cshperspect.a011726.

Novais, C. M.; Pires-Alves, M.; Silva, F.F. 2004. PCR em tempo Real, Uma inovação tecnologica da reacção em Cadeia da Polimerase (PCR). *Revista Biotecnologica Ciência e Desenvolvimento*, 33:10-13.

Nuinoon, M.; Makarasara, W.; Mushiroda, T.; Setianingsih, I.; Wahidiyat, PA.; Sripichai, O.; Kumasaka, N.; Takahashi, A.; Svasti, S.; Munkongdee, T.; Mahasirimongkol, S.; Peerapittayamongkol, C.; Viprakasit, V.; Kamatani, N.; Winichagoon, P.; Kubo, M.; Nakamura, Y.; Fucharoen, S. 2010. A genome-wide association identified the common genetic variants influence disease severity in  $\beta^0$ -thalassemia/hemoglobin E. *Human Genetics*, 127 (3): 303–314. DOI:10.1007 / s00439-009-0770-2.

Pereira, C.; Relvas, L.; Bento, C.; Abade, A.; Ribeiro, M. L.; Manco, L. 2015. Polymorphic variations influencing fetal hemoglobin levels: Association study in beta-thalassemia carriers and in normal individuals of Portuguese origin. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 54 (4): 315-320. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bcmd.2015.02.001>

Platt, O. S.; Brambilla, D.J.; Rosse, W.F.; Milner, P.F.; Castro, O.; Steinberg, M. H.; Klug, P. P. 1994. Mortality in sickle cell disease. Life expectancy and risk factors for early death. *New England Journal Medicine*, 330: 1639–1644. DOI:10.1056 / NEJM199406093302303.

Philipsen, S.; Hardison. R. C. 2018. Evolution of hemoglobin loci and their regulatory elements. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 70: 2-12. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bcmd.2017.08.001>.

Purcell, S.; Neale, B.; Todd-Brown, K.; Thomas, L.; Ferreira, M.; Bender, D.; Maller, J.; Sklar, P.; Bakker, P.; Daly, M.; Sham, P. 2007. PLINK: A Tool Set for Whole-Genome. Association and Population-Based Linkage Analyses. *The American Journal of Human Genetics*, 81: 559-575.

Radmilovic, M.; Zukic, B.; Petrovic, M.S.; Bartsakoulia, M.; Stankovic, B.; Kotur, N.; Dokmanovic, L.; Georgitsi, M.; Patrinos, G. P.; Pavlovic, S. 2013. Functional analysis of a novel KLF1 gene promoter variation associated with hereditary persistence of fetal hemoglobin. *Annals of Hematology*, 92: 53-58. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00277-012-1625-9>.

Ribeiro, M.L.; Gonçalves, P.; Cunha, E.; Bento, C.; Almeida, H.; Pereira, J.; Núñez, G.M.; Tamagnini, G.P. 1997. Genetic heterogeneity of beta-thalassemia in populations of the Iberian Peninsula. *Hemoglobin*, 21(3):261-9.

Rozen, S; Skaletsky, H. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz, S; Misener, S. (eds.). *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, 2000, NJ, 365-386.

Sanger, F.; Nicklen, S.; Coulson. A. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the national Academy of Sciences USA*, 74: 5463-5467.

Sankaran, V. G.; Menne, T. F.; Xu, J.; Akie, T. E.; Lettre, G.; Van Handel, B.; Mikkola, H. K.; Hirschhorn, J. N.; Cantor, A. B.; Orkin, S. H. 2008. Human fetal hemoglobin expression is regulated by the developmental stage- specific repressor BCL11A. *Science*, 322: 1839-42. DOI:10.1126/science.1165409.

Sankaran, V. G.; Xu, J.; Orkin, S. H. 2010. Advances in the understanding of hemoglobin switching. *British journal of hematology*, 149(2): 181–194. DOI:10.1111/j.1365-2141.2010.08105.x.

Sankaran, V. G.; Orkin, S. H. 2013. The switch from fetal to adult hemoglobin. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 3(1):1-14. DOI:10.1101/cshperspect.a011643.

Schechter, A. N. 2008. Hemoglobin research and the origins of molecular medicine. *Blood*, 112(10): 3927-3938.

Sheehan, V. A.; Crosby, J. R.; Sabo, A.; Mortier, N. A.; Howard, T. A.; Muzny, D. M.; Dugan-Perez, S.; Aygun, B.; Nottage, K. A.; Boerwinkle, E.; Gibbs, R. A.; Ware, R. E.; Flanagan, J. M. 2014. Whole exome sequencing identifies novel genes for fetal hemoglobin response to hydroxyurea in children with sickle cell anemia. *PLOS ONE*, 9(10):1-8. DOI: 10.1371 / journal.pone.0110740.

Sikdar, M. 2016. Hemoglobin E in Northeast India: A review on its origin, distribution, migration and health implication. *Anthropological Review*, 79(3): 241–263. DOI:10.1515/anre- 2016-00 19.

Susanne, C.; Chiarelli. B.; Salces, I. 2003. Bases genéticas. In: Susanne, C.; Rebato. E.; Chiarelli. B. (eds.). *Antropologia biológica evolução e biologia humana*. Edições PIAGET.

Taylor, S. M.; Cerami, C.; Fairhurst, R. M. 2013. Hemoglobinopathies: slicing the Gordian knot of Plasmodium falciparum malaria pathogenesis. *PLOS Pathogens*, 9(5):1-10. DOI:10.1371/journal.ppat.1003327.

Taylor, S. M.; Fairhurst, R. M. 2014. Malaria parasites and red cell variants: when a house is not a home. *Current opinion in hematology*, 21(3): 193-200. DOI:10.1097/MOH.0000000000000039.

Teixeira, A. T.; Garcia, C.; Feirreira, T.; Dias, A.; Trindade, C.; Barroso, R. 2018. Rastreio Neonatal de Hemoglobinopatias: A Experiência de um Hospital de Nível II na Área Metropolitana de Lisboa. *Acta Pediátrica Portuguesa*, 49: 228-34. DOI: 10.21069/APP.2018.11781.

Thein, S. L. 2013. The molecular basis of  $\beta$ -thalassemia. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 3(5):1-24. DOI:10.1101/cshperspect.a011700.

Thein, S.L. 2017. Genetic Basis and Genetic Modifiers of  $\beta$ -Thalassemia and Sickle Cell Disease. In: Malik, P.; Tisdale, J. (eds.). *Gene and Cell Therapies for Beta-*

*Globinopathies. Advances in Experimental Medicine and Biology.* Springer, New York, NY: 27-57.

Thein, S. L. 2018. Molecular basis of  $\beta$  thalassemia and potential therapeutic targets. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 70:54-65. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bcmed.2017.06.001>.

Thein, S. L.; Menzel, S. 2009. Discovering the genetics underlying fetal hemoglobin production in adults. *British Journal of Hematology*, 145: 455-467. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2009.07650.x>

Thein, S. L.; Menzel, S.; Lathrop, M.; Garner, C. 2009. Control of fetal hemoglobin: new insights emerging from genomics and clinical implications. *Human Molecular Genetics*, 18: 216–223. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/hmg/ddp401>.

Thein, S. L.; Menzel, S.; Peng, X.; Best, S.; Jiang, J.; Close, J.; Silver, N.; Gerovasilli, A.; Ping, C.; Yamaguchi, M.; Wahlberg, K.; Ulug, P.; Spector, T. D.; Garner, C.; Matsuda, F.; Farrall, M.; Lathrop, M. 2007. Intergenic variants of HBS1L-MYB are responsible for a major quantitative trait locus on chromosome 6q23 influencing fetal hemoglobin levels in adults. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(27): 11346–11351. DOI:10.1073/pnas.0611393104.

Thom, C. S.; Dickson, C. F.; Gell, D. A.; Weiss, M. J. 2013. Hemoglobin variants: biochemical properties and clinical correlates. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 3(3):1-22. DOI:10.1101/cshperspect.a011858.

Uda, M.; Galanello, R.; Sanna, S.; Lettre, G.; Sankaran, V. G.; Chen, W.; Usala, G.; Busonero, F.; Maschio, A.; Albai, G.; Piras, M. G.; Sestu, N.; Lai, S.; Dei, M.; Mulas, A.; Crisponi, L.; Naitza, S.; Asunis, I.; Deiana, M.; Nagaraja, R.; Perseu, L.; Satta, S.; Cipollina, M. D.; Sollaino, C.; Moi, P.; Hirschhorn, J. N.; Orkin, S. H.; Abecasis, G. R.; Schlessinger, D.; Cao, A. 2008. Genome-wide association study shows BCL11A associated with persistent fetal hemoglobin and amelioration of the phenotype of beta-thalassemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(5): 1620-1625. DOI: 10.1073 / pnas.0711566105.

Vathipadiekal, V., Alsultan, A., Baltrusaitis, K., Farrell, J. J., Al-Rubaish, A. M., Al-Muhanna, F., Naserullah Z, Suliman A, Patra PK, Milton JN, Farrer LA, Chui DH, Al-Ali AK, Sebastiani P, Steinberg, M. H. (2016). Homozygosity for a haplotype in the

HBG2-OR51B4 region is exclusive to Arab-Indian haplotype sickle cell anemia. *American journal of hematology*, 91(6): 308–311. DOI:10.1002/ajh.24368.

Wahlberg, K.; Jiang, J.; Rooks, H.; Jawaid, K.; Matsuda, F.; Yamaguchi, M.; Lathrop, M.; Thein, S. L.; Best, S. 2009. The HBS1L-MYB intergenic interval associated with elevated HbF levels shows characteristics of a distal regulatory region in erythroid cells. *Blood*, 114(6): 1254-1262. Disponible em: <https://doi.org/10.1182/blood-2009-03-210146>.

Waye, J. S.; Eng, B. 2015. Krüppel- like factor 1: hematologic phenotypes associated with *KLF1* gene mutations. *International Journal of Laboratory Hematology*, 37: 78-84. DOI:10.1111/ijlh.12356.

Weatherall, D. J. 2001. Globin genes, human. *Academic press*: 878-881. DOI: 10.1006/rwgn.2001.0567.

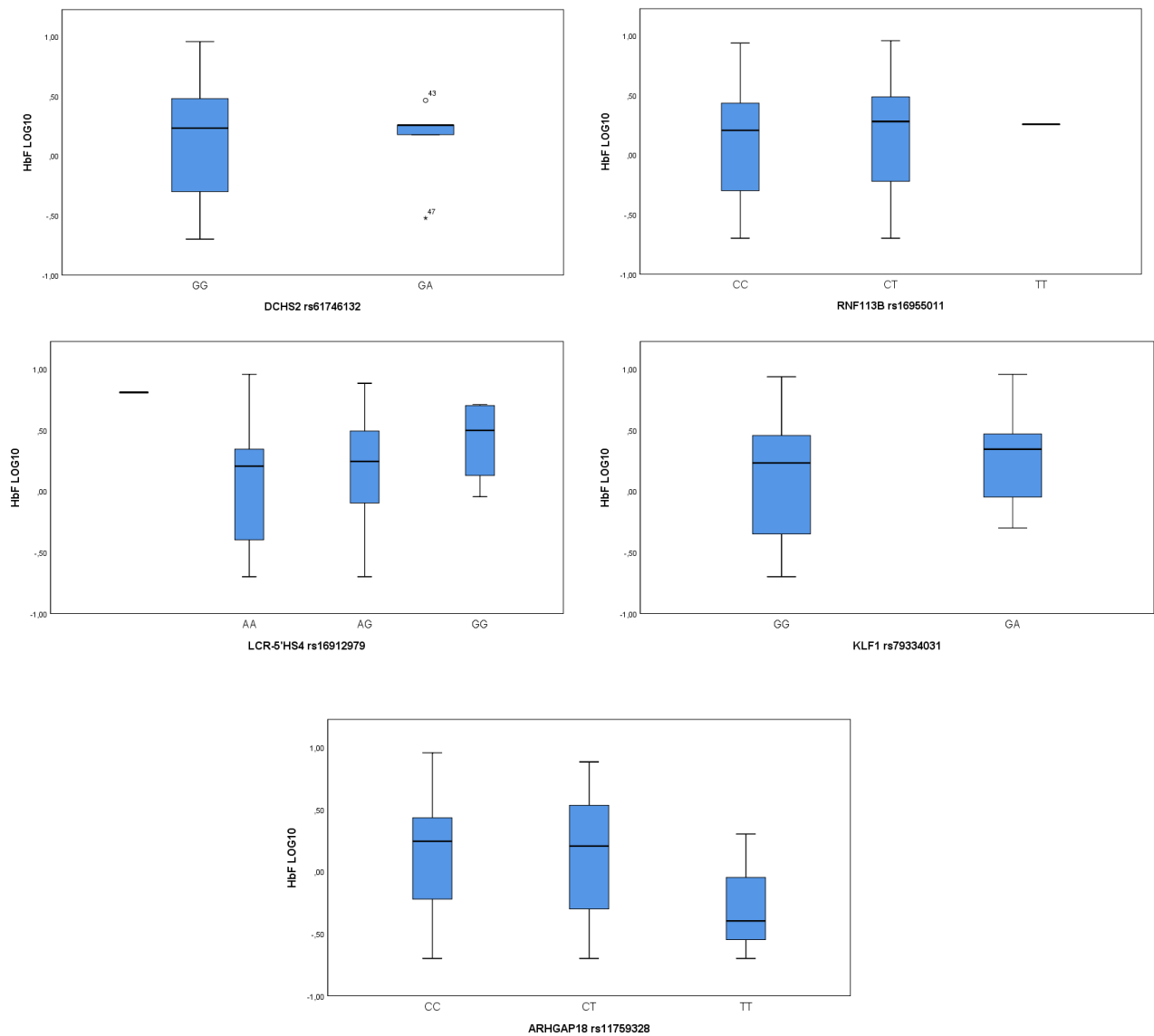
Weatherall, D. J. 2010. The inherited diseases of hemoglobin are an emerging global health burden. *Blood*, 115(22), 4331-4336. DOI:10.1182/blood-2010-01-251348.

Weatherall, D. J. 2012. Commentary on “The modifying effect of *Xmn1-HBG2* on thalassemic phenotype is associated with its linked elements in the beta globin locus control region, including the palindromic site at 5' HS4” by M. Neishabury et al. *Blood Cells, Molecules, and Disease*, 48(1):6. DOI: 10.1016/j.bcmd.2011.11.003.

Weatherall, D.; Akinyanju, O.; Fucharoen, S.; Olivieri, N.; Musgrove, P. 2006. Inherited Disorders of Hemoglobin. In: Jamison, D. T.; Breman, J. G.; Measham, A. R. (eds.). *Disease Control Priorities in Developing Countries*. 2 edition. Washington (DC): Co-published by Oxford University Press, New York. Disponible em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK11727/>.

# Apêndice

Box-plots da distribuição do nível de HbF (log-transformada) no grupo de indivíduos com  $\beta$ -talassemia *minor*







## **Anexos**

---

### **Anexo 1-Protocolo de extração de DNA com o kit Favorgen**

#### **Passo 1 – Lise**

1. Preparar tubos de 1,5ml com 600µl de RBC lysis buffer;
2. Adicionar 200µl de sangue;
3. Misturar agitando ligeiramente a mistura e centrifugar 5 minutos a 10 000rpm;
4. Eliminar o sobrenadante;
5. Adicionar 200µl de FABG buffer e 20µl de proteinase K;
6. Vortex (5 a 10 segundos), para homogeneizar pellet. Colocar na estufa a 56°C durante 1h, se possível em agitação;

#### **Passo 2 – Binding**

1. Preparar Elution buffer a 70°C, para passo a frente;
2. Adicionar 200µl de etanol (96-100%). Vortex 10 segundos;
3. Colocar coluna FABG em tubo de 2ml, e transferir a mistura para a coluna; Centrifugar 5min a 12000rpm. Esvaziar tubo e recolocar coluna.

#### **Passo 3 – Lavagem**

1. Adicionar 400µl de W1 buffer. Centrifugar 1min a 12000rpm. Esvaziar tubo e recolocar coluna;
2. Adicionar 600µl de wash buffer. Centrifugar 1min a 12000rpm. Esvaziar tubo e recolocar coluna;
3. Centrifugar a 12000rpm durante 3min.

#### **Passo 4 – Eluição**

1. Transferir coluna FABG para tubo coletor de 1,5ml;
2. Adicionar 50µl de Elution Buffer (70°C) para recolha de DNA.

3. Centrifugar 1min a 12000rpm 4. Guardar tubos coletores, com DNA, a 4°C ou -10°C.

## **Anexo 2-** Protocolo Silver-Staining (Budowle *et al.*, 1991)

1. Etanol (10%), em agitação durante 10 min;
2. Ácido nítrico (1%), em agitação durante 5 min;
3. Lavagem com água destilada, duas vezes durante 30 s;
4. Nitrato de prata ( $\text{AgNO}_3$ ) (0,2%), em agitação durante 20 min;
5. Lavagem com água destilada, duas vezes durante 30 s;
6. Carbonato de sódio (0,28M) e formaldeído 0,02%, em agitação durante 2 à 5 min;
7. Ácido acético (10%), durante 30 s (paragem da reação);
8. Lavagem com água destilada.