



Caracterização das variantes de Hemoglobina encontradas durante um Programa de Rastreamento Neonatal de Anemia das Células Falciformes em Angola

RITA ISABEL PAULO ESTOPA

(Licenciada em Ciências Biomédicas Laboratoriais)

Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Engenharia Biomédica

Orientador:

Doutor Rui Miguel Duque de Brito

Júri:

Presidente: Doutora Marisa Cebola

Vogais:

Doutora Ana Maria De São Pedro Pires

Doutor Rui Miguel Duque de Brito

Setembro 2025

Caracterização das variantes de Hemoglobina encontradas durante um Programa de Rastreio Neonatal de Anemia das Células Falciformes em Angola

RITA ISABEL PAULO ESTOPA

(Licenciada em Ciências Biomédicas Laboratoriais)

Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Engenharia Biomédica

Orientador:

Doutor Rui Miguel Duque de Brito, ESTeSL/IPL

Júri:

Presidente: Doutora Marisa Cebola, ESTeSL/IPL

Vogais:

Doutora Ana Maria De São Pedro Pires, Instituto Universitário Atlântica

Doutor Rui Miguel Duque de Brito, ESTeSL/IPL

Setembro 2025



Caracterização das variantes de Hemoglobina encontradas durante
um Programa de Rastreio Neonatal de Anemia das Células
Falciformes em Angola

Rita Isabel Paulo Estopa

2025

Este projeto foi financiado pelo Instituto Politécnico de Lisboa para o projeto IPL/IDI&CA2024/GenFalci_ESTeSL. O presente trabalho foi desenvolvido no *Health & Technology Research Center (H&TRC)*, localizado na Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa (ESTeSL), sob supervisão do Professor Doutor Rui Miguel Duque Brito (ESTeSL).

O Instituto Politécnico de Lisboa tem o direito ilimitado e intemporal de arquivar e publicar esta dissertação através de cópias digitais ou físicas, ou qualquer outro meio que considerem adequado, com objetivos de investigação ou educação, não comerciais, desde que o autor seja reconhecido para tal.

Agradecimentos

Pretendo expressar a minha gratidão ao meu orientador, Professor Doutor Miguel Brito, pela orientação e disponibilidade constante para esclarecer dúvidas e orientar o meu trabalho. Deixo um agradecimento especial à Catarina Ginete, aluna de doutoramento, que se mostrou sempre disponível para responder às minhas questões e cujo trabalho no laboratório foi indispensável para o desenvolvimento desta dissertação.

Ao Instituto Politécnico de Lisboa, agradeço o financiamento concedido através do projeto IPL/IDI&CA2024/GenFalci_ESTeSL.

Agradeço à minha grande amiga e colega Ana Rita Canadas, que começou por ser uma colega de trabalho e rapidamente se transformou numa das pessoas mais importantes da minha vida. Mais do que uma colega, tornou-se a minha parceira inseparável, tanto academicamente, como no nosso atual emprego. A Rita tem a rara capacidade de me puxar para cima nos momentos de desânimo e de me lembrar que sou capaz de mais do que penso. No entanto, sei que sem ela não teria chegado até aqui, pelo menos não de forma tão leve. Trabalhar com ela nunca foi um esforço, mas sim um privilégio. Agradeço também ao meu amigo e colega Tiago pelas palavras certas nos momentos difíceis e pela confiança que sempre demonstrou em mim.

Ao Miguel, que representa o meu maior porto seguro e com quem tenho tido o prazer de crescer ao longo destes últimos 9 anos. Agradeço-lhe por ser o meu apoio inabalável em todas as circunstâncias, por acreditar em mim mesma quando duvido das minhas próprias capacidades e por sempre ter uma palavra carinhosa para me dar. É ele que me motiva a ser melhor, que me lembra de descansar quando quero carregar o mundo às costas, e quem me devolve o sorriso quando tudo parece correr mal. A sua paciência, cuidado e amor foram fundamentais para que chegasse até aqui. Este trabalho é também seu, pois em cada página está refletido o apoio constante que me ofereceu.

À minha mãe, pelo amor incondicional, por ser incansável na busca do meu bem-estar e pelo apoio em todas as fases da minha vida. Para ela, não preciso de mais palavras, pois todas as do mundo serão insuficientes para expressar a minha gratidão.

Por fim, quero agradecer às minhas colegas de trabalho, do Hospital Beatriz Ângelo, que inevitavelmente tiveram de lidar com os meus dias menos bons. A elas, um especial agradecimento pela compreensão e pelo apoio.

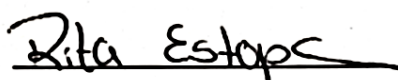
Para todos os mencionados, um obrigado não chega.

Declaração de integridade

Declaro que esta dissertação é o resultado da minha investigação pessoal e independente. O seu conteúdo é original e todas as fontes listadas nas referências bibliográficas foram consultadas e estão devidamente mencionadas no texto. Mais declaro que todas as referências científicas e técnicas relevantes para o desenvolvimento do trabalho estão devidamente citadas e constam das referências bibliográficas.

A autora

(Rita Isabel Paulo Estopa)

A handwritten signature in black ink that reads "Rita Estopa". The signature is written in a cursive style and is underlined with a single horizontal line.

Lisboa, 25 de setembro de 2025

”

“Science knows no country, because knowledge belongs to humanity, and is
the torch which illuminates the world.”

- **Louis Pasteur**

Caracterização das variantes de Hemoglobina encontradas durante um Programa de Rastreamento Neonatal de Anemia das Células Falciformes em Angola

Resumo

As hemoglobinopatias consistem num grupo heterogéneo de doenças genéticas, tendo uma elevada prevalência global, particularmente em África, destacando-se a Anemia das Células Falciformes (ACF) e as Talassemias. Em Angola, apesar de ser conhecida a elevada prevalência de ACF, a diversidade genética das variantes de hemoglobina permanece pouco caracterizada, limitando o desenvolvimento de estratégias de rastreio e de intervenção médica. Tem sido, ao longo dos anos, comprovado o importante papel do rastreio neonatal na redução da mortalidade infantil associada a hemoglobinopatias. Esta dissertação teve como objetivo caracterizar molecularmente as variantes de hemoglobina detetadas durante um Programa de Rastreio Neonatal de ACF, contribuindo para o conhecimento epidemiológico no país.

Foram analisadas por Focagem Isoelétrica (IEF) 13 256 amostras de recém-nascidos, tendo-se selecionado 45 dessas amostras, que demonstraram perfis eletroforéticos atípicos, para análises moleculares complementares, nomeadamente PCR-RFLP, Gap-PCR e sequenciação de Sanger.

Foram confirmadas variantes estruturais de elevada prevalência, como HbS e HbC, bem como variantes menos expectáveis, como HbE, sugerindo fenómenos de ancestralidade ou migração. Os resultados revelaram que 26,7% das amostras atípicas apresentavam genótipo AS, 17,8% genótipo AC, 2,2% genótipo AE e 2,2% genótipo SS, permanecendo 51,1% inconclusivas, sobretudo devido a limitações técnicas, fraca qualidade do DNA extraído de sangue seco e dificuldades na amplificação dos genes HBA. Foram ainda detetados SNPs reportados como benignos (rs10768683 e rs713040), mas cuja relevância clínica demonstra carecer de investigação adicional.

Este estudo reforça a importância da combinação de métodos fenotípicos e moleculares para a confirmação diagnóstica de hemoglobinopatias, especialmente em contextos de elevada diversidade genética. A identificação de variantes inesperadas sublinha a necessidade de abordagens diagnósticas mais abrangentes, contemplando fenómenos migratórios e uma gama mais alargada de hemoglobinopatias. Os dados obtidos

fornece suporte científico para a consolidação e otimização de programas de rastreio neonatal em Angola, com potencial aplicabilidade em outros contextos africanos.

Palavras-chave: Hemoglobinopatias, Anemia das Células Falciformes, Rastreio neonatal, África Talassemias.

Characterization of Hemoglobin Variants Identified During a Neonatal Screening Program for Sickle Cell Disease in Angola

Abstract

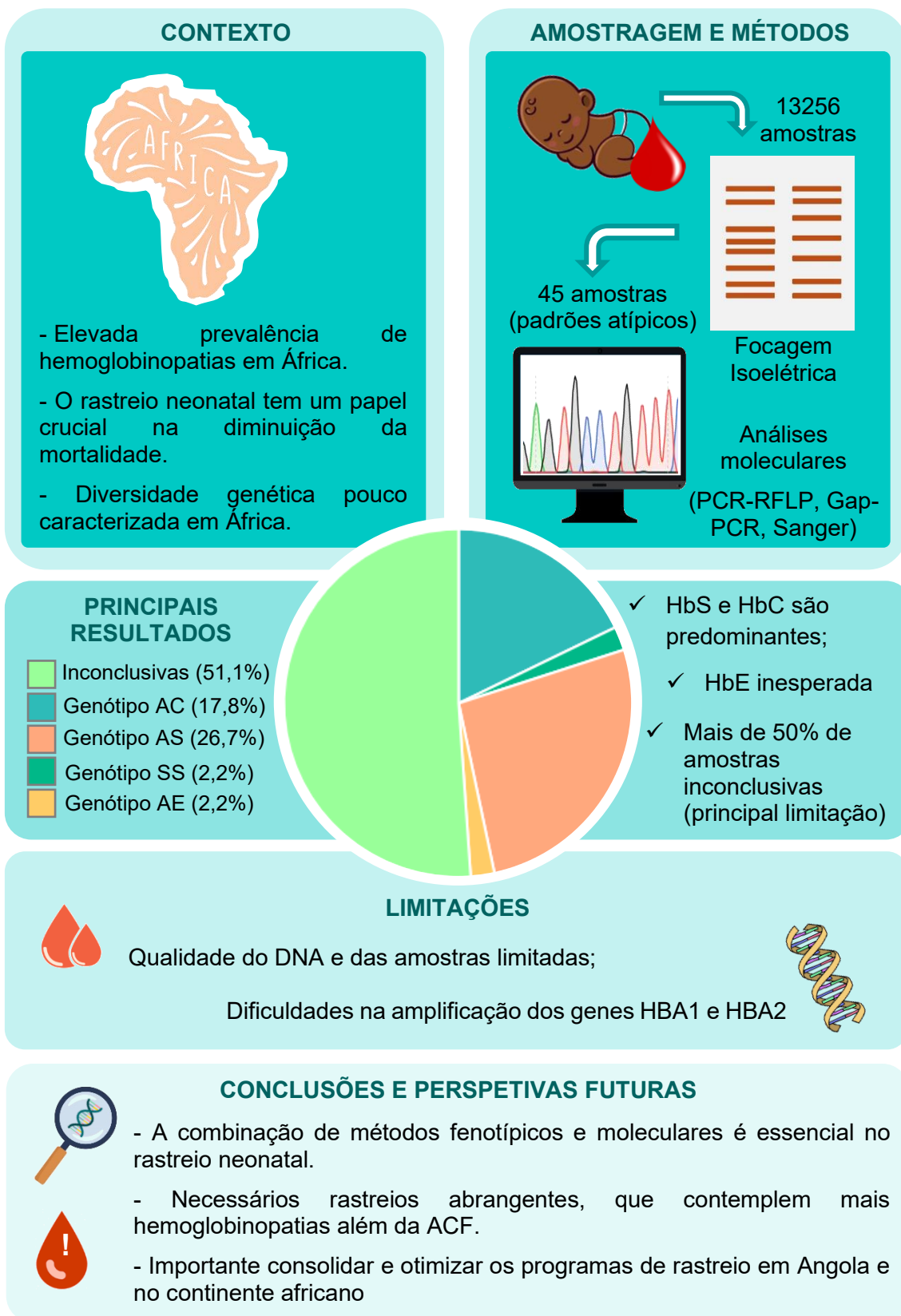
Hemoglobinopathies comprise a heterogeneous group of genetic disorders with high global prevalence, particularly in Africa, with Sickle Cell Disease (SCD) and Thalassemias standing out. In Angola, despite the well-known high prevalence of SCD, the genetic diversity of hemoglobin variants remains poorly characterized, limiting the development of screening strategies and medical interventions. Over the years, the important role of neonatal screening in reducing infant mortality associated with hemoglobinopathies has been demonstrated. This dissertation aimed to molecularly characterize hemoglobin variants detected during a Neonatal Screening Program for SCD, contributing to the epidemiological knowledge in the country.

A total of 13,256 newborn samples were analyzed by Isoelectric Focusing (IEF), from which 45 samples showing atypical electrophoretic profiles were selected for complementary molecular analyses, namely PCR-RFLP, Gap-PCR, and Sanger sequencing. Structural variants of high prevalence, such as HbS and HbC, were confirmed, as well as less expected variants, such as HbE, suggesting phenomena of ancestry or migration. Results revealed that 26.7% of atypical samples presented the AS genotype, 17.8% the AC genotype, 2.2% the AE genotype, and 2.2% the SS genotype, while 51.1% remained inconclusive, mainly due to technical limitations, poor quality of DNA extracted from dried blood spots, and difficulties in amplifying the HBA genes. SNPs reported as benign (rs10768683 and rs713040) were also detected, though their clinical relevance still requires further investigation.

This study reinforces the importance of combining phenotypic and molecular methods for the diagnostic confirmation of hemoglobinopathies, especially in contexts of high genetic diversity. The identification of unexpected variants highlights the need for broader diagnostic approaches, considering migratory phenomena and a wider range of hemoglobinopathies. The data obtained provide scientific support for the consolidation and optimization of neonatal screening programs in Angola, with potential applicability in other African contexts.

Keywords: Hemoglobinopathies, Sickle Cell Disease, Neonatal screening, Africa, Thalassemias.

Resumo Gráfico



Lista de Símbolos, Siglas e Abreviaturas

Alfabeto grego

α – alfa

δ – delta

β – beta

ϵ – épsilon

$A\gamma$ – gama A

$A\gamma$ – gama G

Siglas e abreviaturas

$\alpha_2\epsilon_2$ - Hemoglobina Gower 2

$\alpha\alpha / \alpha\alpha$ – Genótipo normal, com 4 genes alfa funcionais

$-\alpha / \alpha\alpha$ – Genótipo portador silencioso de alfa talassemia, com 3 genes alfa funcionais

$-\alpha / -\alpha$ ou $-- / \alpha\alpha$ – Genótipo traço alfa-talassémico, com 2 genes alfa funcionais

$-- / -\alpha$ – Genótipo doença de HbH, com um gene alfa funcional

$-- / --$ - Genótipo hidrúpsia fetal por Hemoglobina Bart's, com a ausência de genes alfa funcionais

- $\alpha 3.7^{kb}$ - deleção alfa 3.7kb

- $\alpha^{4.2kb}$ – deleção alfa 4.2kb

β^+ - Redução da produção das cadeias beta

β^0 - Ausência da produção das cadeias beta

β^0 / β^0 – Genótipo Beta-talassemia major, sem produção de cadeias beta

β^+ / β^+ - Genótipo Beta-talassemia intermédia, com produção reduzida das cadeias beta

β^0 / β^+ - Genótipo Beta-talassemia intermédia, com produção reduzida de uma cadeia beta e ausência de produção da outra

$\zeta_2\epsilon_2$ - Hemoglobina Gower 1

$\zeta_2\gamma_2$ - Hemoglobina Portland

$\Psi\alpha 1$ - pseudo alfa 1

$\Psi\alpha 2$ - pseudo alfa 2

$\Psi\beta$ - pseudo beta

$\Psi\zeta$ - pseudo zeta

ACF – Anemia das Células Falciformes

A – Adenina

C – Citosina

CONSA - Consórcio para Rastreamento Neonatal em África

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

dNTPs - Desoxinucleótidos

ddNTPs - Didesoxinucleótidos

EC – Eletroforese Capilar

EUA – Estados Unidos da América

G - Guanina

HPLC - Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC)

Hb – Hemoglobina

HbA – Hemoglobina A

HbA₂ – Hemoglobina A₂

HbE – Hemoglobina E

HbC – Hemoglobina C

HbF – Hemoglobina Fetal

HbS – Hemoglobina S

HbG^{Ph} – Hemoglobina G-Philadelphia

IEF - Focagem Isoelétrica

MgCl₂ – Cloreto de Magnésio

OMS – Organização Mundial de Saúde

PCR – *Polymerase Chain Reaction*

PCR-RFLP - *Polymerase Chain Reaction – Restriction Fragment Length Polymorphism*

POC – Point of Care

PIs - Pontos Isoelétricos

T – Timina

TBE – Tris-Borato-EDTA

TCA – Ácido Tricloroacético

Índice

1. INTRODUÇÃO	1
2. CONTEXTUALIZAÇÃO TEÓRICA.....	3
2.1. HEMOGLOBINA	3
2.2. HEMOGLOBINOPATIAS EM ÁFRICA.....	6
2.2.1. Anemia das Células Falciformes	6
2.2.2. Síndromes Talassémicas	7
2.2.3. Outras Variantes.....	13
2.3. RASTREIO NEONATAL DE HEMOGLOBINOPATIAS	14
2.4. METODOLOGIAS LABORATORIAIS PARA INVESTIGAÇÃO DE HEMOGLOBINOPATIAS	19
2.4.1. Focagem Isoelétrica	19
2.4.2. Cromatografia Líquida de Alta Performance	23
2.4.2. Eletroforese Capilar	25
2.4.3. <i>Polymerase Chain Reaction (PCR)</i>	27
2.4.4. <i>PCR- Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR – RFLP)</i>	28
2.4.5. Gap-PCR:.....	29
2.4.6. Sequenciação de Sanger	29
3. OBJETIVOS	33
3.1. OBJETIVO GERAL.....	33
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	35
4.1. TIPO DE ESTUDO E POPULAÇÃO	35
4.2. ASPETOS ÉTICOS	36
4.3. COLHEITA DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS.....	35
4.4. FOCAGEM ISOELÉTRICA	36

4.5.	EXTRAÇÃO DE DNA	37
4.6.	PCR-RFLP PARA DETEÇÃO DO SNP RS334 (HBS)	37
4.7.	PESQUISA DA DELEÇÃO -A ^{3.7KB}	39
4.8.	AMPLIFICAÇÃO DO GENE HBB	41
4.9.	AMPLIFICAÇÃO DOS GENES HBA1 E HBA2	43
4.10.	SEQUENCIAÇÃO DE SANGER DOS GENES ALFA E BETA	44
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	47
5.1.	FOCAGEM ISOELÉTRICA E PCR-RFLP	47
5.2.	AMPLIFICAÇÃO DOS GENES HBA E HBB POR PCR	60
5.3.	SEQUENCIAÇÃO DE SANGER.....	62
5.2.2.	Sequenciação do gene HBB.....	62
5.2.2.1.	Identificação de Polimorfismos de Nucleótido Único (SNPs) com elevada heterozigosidade	72
5.2.3.	Sequenciação dos genes HBA	75
5.2.4.	PESQUISA DA DELEÇÃO -A ^{3.7KB}	78
6.	CONCLUSÃO E PERSPETIVAS FUTURAS.....	81
7.	REFERÊNCIAS.....	85
8.	APÊNDICES.....	96
9.	ANEXOS	107

Índice de Figuras

Figura 2.1: Representação da estrutura de hemoglobina, composta por duas cadeias α e duas cadeias β , contendo cada cadeia um grupo heme com um átomo de ferro. Adaptado de Rosenberg and Rosenberg (2012) <i>Human Genes and Genomes</i> [6].	4
Figura 2.2: Clusters dos genes da cadeia α -globina (A) e da cadeia β -globina (B). Adaptado de Lee J-S, et al. (2021) <i>Blood Research</i> 56 [16].	5
Figura 2.3: Classificação da alfa-talassemia de acordo com o número de genes deletados ou não funcionais. Adaptado de Musallam K. et al. (2024) <i>Blood Reviews</i> 64 [44].	12
Figura 2.4: Esquema representativo da deleção - $\alpha^{3,7}$, que origina o gene híbrido HBA2/HBA1. A deleção remove o exão 3 do gene HBA2 e os exões 1 e 2 do gene HBA1. Adaptado de Alderei L, et al. (2023) <i>Thalassemia Reports</i> 14 [54].	13
Figura 2.5: Mobilidade relativa de várias variantes de hemoglobina em Focagem Isoelétrica. As variantes de Hgb mencionadas no capítulo 2.2 encontram-se destacadas a cor de laranja. As Hb realçadas com a cor azul são as expectáveis de encontrar numa IEF de uma amostra neonatal normal. Adaptado de Bain, Barbara J. et al., 2011 [1].	22
Figura 2.6: Esquema representativo do processo de HPLC para separação de hemoglobinas. A amostra é injetada no sistema, é transportada pela fase móvel através da coluna cromatográfica e as hemoglobinas são separadas com base no seu tempo de retenção. À medida que saem da coluna são detetadas por absorção de luz, gerando um cromatograma com picos específicos para cada hemoglobina. Adaptado de: <i>Shimadzu Corporation</i> [79].	24
Figura 2.7: Esquema representativo do processo de Eletroforese Capilar para separação de hemoglobinas. A amostra é injetada num capilar de sílica preenchido por um tampão alcalino e é submetida a um campo elétrico. O fluxoeletrosmótico move as moléculas em direção ao cátodo. As hemoglobinas migram a velocidades distintas e são detetadas por absorção de luz ao alcançarem o detetor, gerando um eletroferograma. Adaptado de: <i>Association of Public Health Laboratories</i> , 2015 [73].	26

Figura 2.8: Esquema representativo da sequenciação de DNA pelo método de Sanger. A amostra de DNA é amplificada por PCR com dNTPs e ddNTPs, estes últimos marcados com fluoróforos. A incorporação aleatória dos ddNTPs gera fragmentos de diferente comprimentos, cada um terminando com uma base marcada. Após separação por eletroforese capilar, os fragmentos passam por um feixe laser, são detetados com base na emissão fluorescente e convertidos num cromatograma, que representa a sequência do DNA. Adaptado de Sigma-Aldrich [93].	31
Figura 4.1: Representação esquemática dos locais de ligação dos <i>primers</i> A, B, C e A', usados no Gap-PCR para a pesquisa da deleção - $\alpha^{3.7}$.	40
Figura 4.2: Diagrama de Atividades UML correspondente à implementação do código para o alinhamento local das sequências das amostras com a sequência de referência, utilizando o algoritmo de <i>Smith-Waterman</i> .	46
Figura 5.1: Perfil de migração do controlo.	47
Figura 5.2: Fenótipos identificados pela IEF.	48
Figura 5.3: Exemplo dos padrões dos genótipos SS, AA e AS no gel de eletroforese. Genótipo SS: uma banda de 377pb. Genótipo AA: uma banda de 201pb e uma de 176pb. Genótipo AS: uma banda de 377pb, uma banda de 201pb e uma banda de 176pb. Note-se que as bandas de 201 e 176pb aparentam ser uma só devido à proximidade dos seus tamanhos.	49
Figura 5.4: Focagens isoelétricas das amostras R1 (A), R2 (B), R4 (C) e R22 (D), que se encontram identificadas pelas setas pretas. Presença de bandas ténues na zona de migração da HbS.	50
Figura 5.5: PCR-RFLP para pesquisa do SNP rs334 (HbS) nas amostras R1, R2, R4 e R22. Em todas as amostras são observadas duas bandas muito próximas (de 176 e 201 pb), o que corresponde ao genótipo AA.	50
Figura 5.6: Focagens isoelétricas das amostras R9 (A), R13 (B), R19 (C) e R20 (D), identificadas pelas setas pretas. Presença de bandas na zona de migração da HbS mais fortes que as bandas da HbA.	51
Figura 5.7: PCR-RFLP para pesquisa do SNP rs334 (HbS) nas amostras R9, R13, R19 e R20. Em todas as amostras são observadas duas bandas muito próximas (de 176 e 201 pb), e outra maior (377 pb) o que corresponde ao genótipo AS.	51

Figura 5.8: Focagens isoeletricas das amostras R3 (A), R6 (B), R7 (C), R8 (D), R18 (E), R10 (F), R11 (G), R14 (H), R21 (I) e R23 (J) e R24 (K), identificadas pelas setas pretas. Presença de bandas na zona de migração da HbC. * Estas amostras apresentaram uma banda extremamente ténue na zona da HbC, apesar de não ser possível visualizar nas fotografias captadas das mesmas.	52
Figura 5.9: Focagens isoeletricas das amostras R5 (A) e R16 (B), identificadas pelas setas pretas. Presença de uma banda extra abaixo da zona de migração da HbS.	53
Figura 5.10: PCR-RFLP para pesquisa do SNP rs334 (HbS) nas amostras 1777 e 9320. Em todas as amostras são observadas duas bandas muito próximas (de 176 e 201 pb), o que corresponde ao genótipo AA.	53
Figura 5.11: Focagens isoeletricas das amostras R28 (A), R27 (B), R33 (C), R34 (D), R35 (E), R36 (F), R37 (G esquerda), R31 (G direita) e R38 (H), R39 (I), R40 (J) e R41 (K), identificadas pelas setas pretas. Observam-se duas bandas extra em todas as amostras, presumivelmente correspondentes à HbG _{Ph} e à HbF com a cadeia alfa mutada.	55
Figura 5.12: PCR-RFLP para pesquisa do SNP rs334 (HbS) nas amostras R28, R27, R33, R34, R35, R36, R37, R31, R38, R39, R40 E R41. Nas amostras R37 e R37 são observadas duas bandas muito próximas (de 176 e 201 pb) uma terceira (377 pb), o que corresponde ao genótipo AS. Nas restantes amostras verificam-se apenas as duas bandas próximas (genótipo AA).	56
Figura 5.13: Focagens isoeletricas das amostras R26 (A), R32 (B), R42 (C), nas quais se observam duas bandas extra (na zona da HbS e abaixo da HbF) e das amostras R30 (D) e R43 (E), que exibem uma banda na zona da HbS, outra abaixo dessa região e uma terceira na zona da HbC.	57
Figura 5.14: PCR-RFLP para pesquisa do SNP rs334 (HbS). A amostras R26, R32 e R42 revelaram ser AA. As amostras R30 e R43 revelaram ser AS.	57
Figura 5.15: Focagens isoeletricas das amostras R29 (A) e R44 (B), identificadas pelas setas pretas, nas quais se observa uma banda extra abaixo da HbF.	58
Figura 5.16: Focagem isoeletrica da amostra R45, identificada pela seta preta. Ausência de HbA, com a presença de bandas perto da zona da HbS e da HbC. ...	59
Figura 5.17: PCR-RFLP da amostra R45, que revelou ser SS.	59

Figura 5.18: Focagens isoeletricas das amostras R15, R15, R17 e R25, identificadas pelas setas pretas. Bandas na zona da HbS.	60
Figura 5.19: PCR-RFLP das amostras R12, R15, R17 e R25, que revelam um padrão de genótipo AS atípico, com uma banda e tamanho inferior ao esperado (seta preta).	60
Figura 5.20: Cromatograma da sequenciação dos exões 1 e 2 do gene HBB, evidenciando o SNP rs334 (HBB: c.20A>T), em heterozigotia, responsável pela HbS.	63
Figura 5.21: Cromatograma da sequenciação dos exões 1 e 2 do gene HBB, evidenciando o SNP rs10768683 (HBB.c.315+16G>C) em heterozigotia.	63
Figura 5.22: Cromatograma da sequenciação dos exões 1 e 2 do gene HBB, evidenciando, em heterozigotia, o SNP rs33930165 (HBB.c.19G>A), responsável pela HbC.	65
Figura 5.23: Cromatograma da sequenciação dos exões 1 e 2 do gene HBB, evidenciando, em heterozigotia, o SNP rs33950507 (HBB. c.79G>A), responsável pela HbE.	66
Figura 5.24: Cromatograma da sequenciação do exão 3 do gene HBB, evidenciando o SNP rs36020563 (HBB: c.432C>T).	68
Figura 5.25: Localização genómica das regiões amplificadas usando os <i>primers</i> do PCR-RFLP (seta laranja) e os da amplificação/sequenciação do gene HBB (seta rosa). O objetivo da sequenciação usando os <i>primers</i> do PCR-RFLP é investigar a zona destacada a vermelho.	69
Figura 5.26: Cromatograma da sequenciação do gene HBB usando o <i>primer reverse</i> do PCR-RFLP, evidenciando, (A) o SNP rs334 (HBB: c.20A>T), em heterozigotia, responsável pela HbS e (B) o SNP 72561473 (HBB: c.-133G>A). Verifica-se que este SNP cria um novo local de restrição da enzima <i>Bsu36I</i> (5' CC↓TNAGG 3').	70
Figura 5.27: Previsão obtida no NEBCutter (v3.020) dos fragmentos originados através da digestão com a enzima de restrição <i>Bsu36I</i> , na sequência não mutada para HbS, mas com o SNP rs72561473.	71
Figura 5.28: Cromatogramas representativos dos vários genótipos observados nos SNP rs10768683 (HBB:c.315+16G>C) e rs713040 (HBB:c.9T>C). (A)	

rs10768683 (genótipo GC); (B) rs10768683 (genótipo CC); (C) rs713040 (genótipo TC); (D) rs713040 (genótipo CC). 74

Figura 5.29: Alinhamento entre as sequências obtidas por sequenciação (Sequência) e as sequencias de referência (Sequenref) dos 3 exões do gene HBA2. O alinhamento evidencia uma correspondência quase total entre as sequências, exceto por pequenos desalinhamentos na extremidade 3', interpretados como artefactos da leitura. Este resultado foi o obtido para todas as amostras sequenciadas para o gene HBA2. 77

Figura 5.30: Cromatograma da sequenciação do gene HBA2. Observa-se a ausência de mutações. A amarelo encontra-se o codão AAC (Asparagina), que seria afetado na presença da mutação responsável pela HbG^{Ph}, passando a codificar uma Lisina. 78

Figura 5.31: Resultados do Gap-PCR para pesquisa da deleção $-\alpha^{3.7kb}$ nas amostras R39, R45 e R30. Observa-se a presença simultânea de fragmentos de 2182, 1900 e 999pb, o que é compatível com a heterozigotia para a deleção ($-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$). As bandas de 2182 e 1900 pb (setas) apresentam-se bastante ténues, sendo de difícil observação nas fotografias captadas. 79

Índice de Quadros

Quadro 2.1: Designação e manifestações clínico-laboratoriais em função do genótipo para os genes alfa.	12
Quadro 2.2: Padrão eletroforético da IEF em função do genótipo	21
Quadro 4.1: <i>Primers</i> utilizados no PCR RFLP para o SNP rs334	38
Quadro 4.2: Condições da reação de PCR para detecção do rs334.....	38
Quadro 4.3: <i>Primers</i> utilizados no Gap-PCR para identificação da deleção - $\alpha^{3\cdot7}$..	40
Quadro 4.4: Condições da reação de PCR para a amplificação dos genes HBA1 e HBA2 para a pesquisa de deleção - $\alpha^{3\cdot7}$	41
Quadro 4.5: <i>Primers</i> utilizados para a amplificação do 1º e 2º exão do gene HBB... ..	42
Quadro 4.6: Condições da reação de PCR para a amplificação do 1º e 2º exão do gene HBB	42
Quadro 4.7: <i>Primers</i> utilizados para a amplificação do 3º exão do gene HBB	43
Quadro 4.8: Condições da reação de PCR para a amplificação do 3º exão do gene HBB	43
Quadro 4.9: <i>Primers</i> utilizados para a amplificação dos 3 exões dos genes HBA1 e HBA2	44
Quadro 4.10: Condições da reação de PCR para a amplificação dos 3 exões dos genes HBA1 e HBA2	44
Quadro 5.1: Genótipos identificados nos rs10768683 e rs713040 no gene HBB ...	74

1. INTRODUÇÃO

As hemoglobinopatias consistem num grupo de doenças genéticas com uma elevada prevalência a nível mundial, sendo as mais reconhecidas a Anemia das Células Falciformes (ACF) e as Talassemias. As hemoglobinopatias resultam de alterações qualitativas ou quantitativas nas cadeias de globina, que constituem a hemoglobina, proteína crucial para o transporte de oxigénio e dióxido de carbono no organismo [2], [3]. Estas condições genéticas traduzem-se numa ampla gama de manifestações clínicas, variando desde formas assintomáticas até quadros severos, com anemia crónica e crises dolorosas [1], [4]. A gravidade e as complicações associadas variam consoante o tipo e a combinação das variantes genéticas herdadas, bem como fatores ambientais e o acesso a cuidados médicos adequados.

É estimado que cerca de 7% da população mundial seja portadora de alguma variante de hemoglobina [5], o que enaltece a relevância do diagnóstico precoce destas condições.

O continente africano, particularmente a África Subsaariana, apresenta uma elevada incidência de hemoglobinopatias, o que resulta, parcialmente, da pressão seletiva exercida pela malária, que favoreceu a disseminação de variantes como as hemoglobinas S e C [6], [7], [8]. Porém, o contexto epidemiológico de muitas regiões africanas permanece pouco estudado devido à escassez de recursos e à ausência de programas de rastreio sistemáticos que sejam abrangentes, tanto a nível populacional, como a nível das variantes pesquisadas.

Tem sido, ao longo dos anos, comprovado o importante papel do rastreio neonatal na redução da mortalidade infantil associada a hemoglobinopatias, como a ACF. A sua implementação tem permitido um aumento da qualidade de vida, bem como um aumento da taxa de sobrevivência devido ao diagnóstico precoce e seguimento clínico

atempado [7], [9], [10]. Isto tem-se verificado tanto em países desenvolvidos, como em países africanos, no âmbito de projetos piloto, mesmo com os seus desafios e recursos limitados [6], [11], [12]. Contudo, para que as populações possam beneficiar cada vez mais deste tipo de programas e para que esses possam evoluir e tornar-se sustentáveis é essencial aprofundar o conhecimento sobre as variantes presentes em cada população. A caracterização das variantes identificadas por técnicas de rastreio é, então, um passo fundamental. A combinação de metodologias laboratoriais como a Focagem Isoelétrica (IEF), a Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC), o PCR-RFLP, o Gap-PCR e a sequenciação de Sanger permite não só confirmar o diagnóstico, mas também identificar variantes raras ou inesperadas com potencial impacto clínico.

A presente dissertação inicia-se com uma contextualização teórica na qual, após uma breve introdução à hemoglobina, é feita uma descrição das hemoglobinopatias mais relevantes, com ênfase nos seus dados epidemiológicos e na sua prevalência em África. De seguida é apresentada uma revisão acerca dos programas de rastreio neonatal de hemoglobinopatias, destacando a sua importância para a redução da mortalidade infantil e o seu estado de implementação em diferentes regiões do mundo, com especial foco em África. Segue-se a descrição das metodologias laboratoriais geralmente utilizadas para a deteção e caracterização das variantes de hemoglobina e, por fim, a apresentação e discussão dos resultados obtidos a partir da análise das amostras recolhidas no âmbito de um programa de rastreio neonatal de ACF em Angola.

2. CONTEXTUALIZAÇÃO TEÓRICA

2.1. HEMOGLOBINA

A hemoglobina (Hb) consiste numa proteína globular com massa molecular de aproximadamente 64.500 Dalton e diâmetro de 6,4 nm [2]. A sua principal função é o transporte reversível de oxigénio, através da corrente sanguínea, dos pulmões para os tecidos. Concomitantemente, a hemoglobina participa no mecanismo responsável pela remoção do dióxido de carbono produzido pelas células, contribuindo para a manutenção do equilíbrio ácido-base do organismo [2], [3].

A hemoglobina é composta por quatro subunidades organizadas em dois pares de cadeias polipeptídicas, designadas por cadeias de globina – duas do tipo alfa (α), com 141 aminoácidos cada, e duas do tipo beta (β), cada uma com 146 aminoácidos. A cada uma das 4 cadeias encontra-se associado um grupo heme, que quando complexado com o ferro, constitui fração transportadora de oxigénio [1], [3], [13], [14]. A hemoglobina humana consiste, então, numa proteína tetramérica, composta por duas cadeias relacionadas ao gene da globina α e duas relacionadas ao gene da globina β [4], [15].

A estrutura primária da hemoglobina refere-se à sequência específica de aminoácidos das suas globinas. Ainda que as cadeias α e β não sejam iguais, existe uma considerável homologia entre elas, havendo 64 resíduos de aminoácidos em posições idênticas em ambas as cadeias. No que concerne à sua estrutura secundária, cerca de 75-80% das cadeias globínicas estão organizadas em hélices e as restantes encontram-se dispostas de forma não helicoidal [2]. Na estrutura terciária, as hélices formam uma conformação tridimensional, que permite a formação de uma bolsa hidrofóbica que aloja o grupo heme, protegendo-o de interações indesejadas que levariam à sua oxidação e

consequente comprometimento da ligação ao oxigénio [1], [2]. Por fim, a estrutura quaternária da hemoglobina consiste na associação de dois dímeros compostos, cada um, por uma cadeia α e uma cadeia β [15]. A Figura 2.1 permite obter uma melhor conceptualização da referida estrutura tetramérica da hemoglobina.

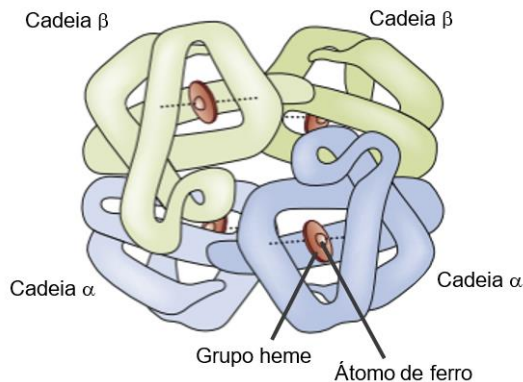


Figura 2.1: Representação da estrutura de hemoglobina, composta por duas cadeias α e duas cadeias β , contendo cada cadeia um grupo heme com um átomo de ferro. Adaptado de Rosenberg and Rosenberg (2012) *Human Genes and Genomes* [14].

As cadeias de globina são codificadas por dois *loci* diferentes, o cluster da globina α , localizado no cromossoma 16p13.3, e o cluster da globina β , localizado no cromossoma 11p15.5 [15]. O cluster α conta com os genes HBZ, HBA1 e HBA2 (Figura 2.2A), que são responsáveis pela codificação das cadeias de globina zeta (ζ), alfa 1 (α_1) e alfa 2 (α_2). Já o cluster β compreende os genes HBE, HBG1, HBG2, HBD e HBB (Figura 2.2B), que codificam, respetivamente, as cadeias de globina epsilon (ϵ), gama A ($A\gamma$), gama G ($G\gamma$), delta (δ) e beta (β) [2], [14]. Estes genes estão dispostos, no genoma, de forma sequencial, sendo diferencialmente expressos a cada fase do desenvolvimento para produzir diferentes tipos de hemoglobina. Os genes HBB, HBA1 e HBA2 possuem uma organização estrutural semelhante, apresentando, cada um, três exões e dois intrões [2]. Essa estrutura é altamente conservada e essencial para garantir a expressão correta do mRNA das globinas.

Além dos referidos genes funcionais, o cluster α inclui ainda três pseudogenes, pseudo zeta ($\Psi\zeta$), pseudo alfa 2 ($\Psi\alpha_2$) e pseudo alfa 1 ($\Psi\alpha_1$). Já o cluster β possui apenas um pseudogene, designado de pseudo beta ($\Psi\beta$) [4], [15], [16]. Na Figura 2.2 encontram-se os mapas dos clusters da α e β globina nos cromossomas 16 e 11, respetivamente.

Durante o desenvolvimento embrionário, fetal e adulto, ocorre uma mudança progressiva na expressão dos genes das globinas, conhecida como "switch" hemoglobínico [15]. As primeiras hemoglobinas a ser produzidas, durante a fase embrionária, são a Hb Gower 1 ($\zeta_2\varepsilon_2$), Hb Gower 2 ($\alpha_2\varepsilon_2$) e Hb Portland ($\zeta_2\gamma_2$), que são expressas pelos genes HBZ e HBE. Essas hemoglobinas são gradualmente substituídas pela hemoglobina Fetal (HbF), que passa a ser predominante durante a fase fetal. Anteriormente ao momento do nascimento inicia-se a produção das hemoglobinas A (HbA) e A₂ (HbA₂). Nos recém-nascidos, a HbF continua a predominar, constituindo 70-80% da hemoglobina circulante. Porém, durante os primeiros 6 meses de vida, essa vai diminuindo gradualmente até 4-5%, havendo concomitantemente um aumento de HbA ($\alpha_2\beta_2$) e de HbA₂ ($\alpha_2\delta_2$), embora a última referida seja produzida em concentrações significativamente mais reduzidas relativamente à HbA. Num adulto, a HbA representa cerca de 97% da hemoglobina total, enquanto a HbA₂ apenas cerca de 2%. Quanto à HbF, esta apresenta, nesta fase, concentrações residuais, abaixo de 1%. Este é o padrão de hemoglobinas típico a partir do primeiro ano de vida, sensivelmente [4], [14], [15], [16].

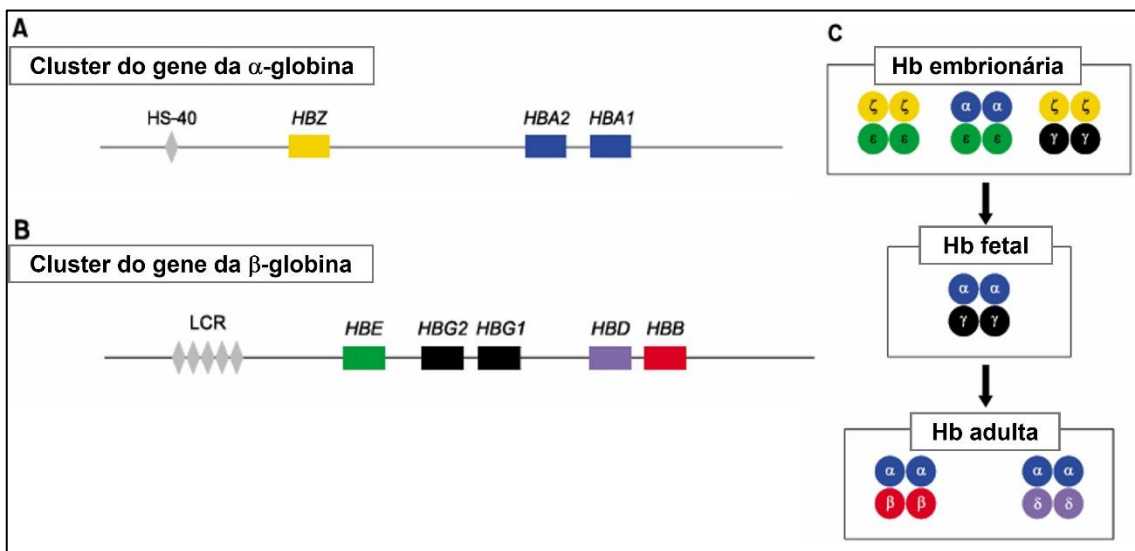


Figura 2.2: Clusters dos genes da cadeia α-globina (A) e da cadeia β-globina (B). Adaptado de Lee J-S, *et al.* (2021) *Blood Research* 56 [16].

2.2. HEMOGLOBINOPATIAS EM ÁFRICA

As hemoglobinopatias dizem respeito ao grupo de doenças genéticas relacionadas com alterações na síntese da hemoglobina, constituindo os distúrbios monogénicos mais comuns a nível mundial [4].

As hemoglobinopatias abarcam duas categorias: as variantes estruturais de hemoglobina, que resultam de alterações na sequência de aminoácidos das cadeias globínicas, levando conseqüentemente a modificações da estrutura da hemoglobina (alterações qualitativas); e as talassemias, que consistem em alterações quantitativas da síntese das cadeias de globina [1], [4].

Estas patologias têm uma elevada prevalência, estimando-se que pelo menos 7% da população mundial seja portadora de uma mutação associada a hemoglobinopatias [17] e que nasçam anualmente cerca de 370 000 indivíduos homocigóticos ou heterocigóticos para estas condições [18]. Além disso, aproximadamente 3.4% das mortes em crianças com idade inferior a 5 anos são decorrentes deste tipo de condições genéticas [19].

Mais de 70% do total de hemoglobinopatias concentram-se no continente africano, com destaque para a Anemia das Células Falciformes e a β -talassemia major. Além disso, é em África que se regista a maior taxa de mortalidade infantil em crianças com menos de 5 anos afetadas por estas patologias [6].

Atualmente, são conhecidas mais de 2000 variantes de hemoglobina, sendo que a nível global, as mais prevalentes são a hemoglobina S (HbS), a hemoglobina C (HbC) e a hemoglobina E (HbE). Entre estas, apenas as duas primeiras apresentam frequências elevadas no continente africano, especialmente em regiões onde a malária foi historicamente endémica, devido ao efeito protetor parcial dessas variantes contra a infeção pelo *Plasmodium falciparum* [19].

2.2.1. Anemia das Células Falciformes

A Anemia das Células Falciformes (ACF) é uma doença genética que se caracteriza pela produção de um tipo anormal de hemoglobina, a hemoglobina S (HbS), identificada pelo rs334 [20], [21]. Esta resulta de uma mutação pontual no gene da β -globina (c.20A>T), no qual se dá a substituição do ácido glutâmico por valina na posição 6 (p. Glu6Val) [1], [20]. Esta mutação conduz a uma alteração da estrutura da molécula de hemoglobina, tornando-a menos solúvel quando desoxigenada, o que leva à

polimerização intracelular da HbS, ocorrendo, conseqüentemente, a deformação dos eritrócitos, que assumem a forma de uma foice [1].

A ACF é um distúrbio autossômico recessivo que ocorre quando um indivíduo herda dois alelos mutados da HbS, resultando em sintomas clínicos grave [12]. Esta condição manifesta-se essencialmente por episódios recorrentes de vaso-oclusão e hemólise, levando a crises dolorosas, anemia moderada e danos progressivos nos órgãos [1], [12]. Já quando é herdado apenas um alelo, trata-se de traço falciforme, cujas manifestações clínicas são geralmente assintomáticas, ainda que possam surgir complicações, como hematúria espontânea, especialmente em condições de baixa oxigenação [1].

A associação da HbS com outras variantes de hemoglobina, como a HbC, ou com talassemia também cursa com manifestações clínicas variáveis, com graus distintos de severidade [12].

A anemia das células falciformes (ACF) é uma das doenças genéticas mais comuns no mundo inteiro, tendo uma elevada prevalência em regiões como a África Subsaariana, Caraíbas, Médio Oriente e algumas zonas da Índia [7], [8]. Estima-se que nasçam anualmente entre 200 a 400 mil crianças com ACF em África [7], [9], sendo que mais de 75% dos casos ocorrem na África Subsaariana [12]. Destas crianças, cerca de 50% acabam por morrer antes dos 5 anos de idade em países de baixa renda [10]. A doença é, então, uma das principais causas de morte não transmissível em crianças entre 5 e 14 anos de idade e tem apresentado uma tendência crescente de mortalidade global, em contraste com outras causas de morte que têm vindo a diminuir [7].

2.2.2. Síndromes Talassémicas

2.2.2.1. Beta-talassemia

A Beta-talassemia (β -talassemia) consiste num grupo heterogéneo de distúrbios genéticos autossômicos recessivos causados por variantes patogénicas no gene HBB, que se localiza no cromossoma 11 [22], [23]. Caracteriza-se pela redução (β^+) ou ausência (β^0) da produção das cadeias de β -globina, o que se traduz numa acumulação excessiva de cadeias α -globina que precipitam, formando corpúsculos de inclusão tóxicos. Isto conduz, conseqüentemente, à destruição precoce dos eritroblastos e eritrócitos [24]. A severidade da doença e dos sintomas clínicos encontra-se diretamente relacionada com o grau de deficiência de cadeias de β -globina podendo, de acordo com esse critério, classificar-se a β -talassemia em 3 tipos [19]: β -talassemia major (genótipo β^0/β^0), que se traduz em anemia grave dependente de transfusões, hemólise,

sobrecarga de ferro e eritropoiese ineficaz; talassemia intermédia (β^+/β^+ ou β^0/β^+), que se caracteriza por anemia de gravidade variável, que pode requerer transfusões ocasionais; talassemia minor (genótipo β/β^+ ou β/β^0), cujos portadores apresentam microcitose assintomática ou anemia leve [24], [25].

Até à data encontram-se reportadas mais de 350 mutações associadas à β -talassemia, embora apenas cerca de 40% delas contribuam para 90% das β -talassemias encontradas na população a nível global [26]. A maioria dessas mutações consistem em mutações pontuais, que podem afetar a transcrição, processamento ou tradução do RNA mensageiro. Dentre as possíveis mutações incluem-se as mutações em promotores e na região 5'UTR, mutações em locais de *splicing*, mutações nonsense, *missense* e *frameshift* e ainda mutações na região de poliadenilação (3'UTR) [19], [22], [26]. Cerca de 50% destas mutações inativam completamente o gene HBB, resultando na ausência de cadeias de β -globina [26]. Contudo, embora incomum, há também β -talassemias resultantes de deleções [24], [26].

A nível global, estima-se que existam cerca de 80 milhões de portadores de β -talassemia. Em termos geográficos, esta condição genética é prevalente em regiões como o Mediterrâneo (especialmente no Chipre e Sardenha), o Médio Oriente, Índia, Sul da China, algumas zonas do Extremo Oriente e no Norte de África [23], [27]. A seleção natural tem favorecido a presença do alelo mutado em heterozigotos, dado oferecer proteção contra a malária por *Plasmodium falciparum* [22], [23]. Este fenómeno contribuiu para a disseminação do gene mutado em populações de regiões endémicas de malária.

A prevalência de portadores varia entre 1 e 20%, sendo raramente superior a estes valores [23], [27]. Relativamente ao continente africano, considera-se a β -talassemia prevalente no norte do continente, havendo vários estudos que relatam a presença de vários tipos de mutações [23], [24], [28]. Já no restante continente africano, nomeadamente na África subsariana, acredita-se que a β -talassemia seja rara. Contudo, esta perceção poderá estar em grande parte influenciada pela falta de estudos abrangentes nessa região. Existem até alguns trabalhos de investigação focados na Anemia das Células Falciformes que identificam a presença de outras hemoglobinopatias, sem que estas sejam investigadas e identificadas [10]. Posto isto, a ausência de rastreios direcionados a esta condição genética na África Subsariana pode, em parte, explicar a sua reduzida notificação. É ainda importante realçar que, anualmente, nascem aproximadamente 1500 crianças com β -talassemia em África, o que impõe uma carga significativa sobre os sistemas de saúde, dada a complexidade e

os custos elevados do tratamento, agravados pela realidade socioeconómica desfavorável da maioria dos países africanos [6].

No que diz respeito ao continente africano, são muito escassos os estudos focados no rastreio de β -talassemias, pelo que os dados relativamente às mutações presentes nessa região são limitados. Por outro lado, têm sido desenvolvidos inúmeros estudos em países árabes, que incluem alguns países do Norte de África, como Marrocos, Tunísia e Argélia. Assim, ao contrário do que acontece na África subsariana, no Norte de África a distribuição das mutações responsáveis pela β -talassemia encontra-se relativamente bem estudada [28], [29], [30].

De acordo com estudos que têm investigado o Norte do continente africano, a mutação mais prevalente e disseminada nessa região é a rs35004220 [IVS I 110 (G>A), HBB: c.93-21G>A] [31], que afeta o processamento do RNA mensageiro (mRNA) [22], [27], [29], [32]. A substituição de G por A na posição 110 do intrão 1 cria um local de *splicing* alternativo, preferencialmente utilizado na maioria dos transcritos, o que provoca a retenção de uma parte do intrão no mRNA. Este segmento retido contém um codão stop prematuro, o que impede a normal produção das cadeias de β -globina. Contudo, o local de *splicing* normal continua a ser usado, embora com pouca frequência, o que permite que continue a haver alguma produção de cadeias de β -globina, ainda que muito reduzida [32], [33]. Desta forma, esta mutação é responsável por uma talassemia β^+ [23], [32]. Apesar de esta mutação ser frequentemente reportada no Norte de África, bem como em países mediterrânicos, há evidências de que possa ser também prevalente noutras regiões, tendo sido já previamente identificada por um estudo desenvolvido na África Subsariana, em Angola [33], e por outro na África Oriental, mais especificamente no Quênia [23].

Outra das mutações mais encontradas nos países do Norte de África já estudados é a rs11549407 [codão 39 (C>T), HBB: c.118C>T] [34], que afeta a tradução do mRNA [32].

Esta mutação traduz-se na substituição do codão 39 por um codão stop prematuro, o que resulta na ausência de produção de cadeias de β -globina. Assim, esta mutação é responsável por um fenótipo severo de β^0 -talassemia [32], [33]. Além de frequentemente identificada em países árabes do Norte de África, os mais estudados no continente, foi também identificada num estudo em Angola [33]. O estudo mencionado identificou a mutação tanto em indivíduos homocigóticos quanto em heterocigóticos, incluindo casos em que se encontrava em associação com a HbS, o que sugere possíveis cenários de β^0 -talassemia falciforme (HbS/ β^0 -talassemia) [33].

A mutação rs33971440 [IVS-I-1 (G>A), HBB: c.92+1G>A] [35], também prevalente em África, refere-se à substituição de G por A na posição 1 do 1º intrão do gene HBB, o que afeta o processamento do mRNA, ao interferir num local 5' de *splicing* (*dador*) [29], [32]. Outra mutação que afeta o *splicing* é a rs193922563 [IVS1-3' end del 25bp, HBB: c.93-22_95del] [36], uma deleção de 25 pb no 1º intrão, que embora seja reconhecida na literatura como distribuída entre a população Indiana e dos Emirados Árabes Unidos, foi já identificada também no Quênia [23]. As últimas mutações referidas traduzem-se ambas em β^0 -talassemia, uma forma severa da doença. As mutações rs35724775 [IVS-I-6 (T>C), HBB: c. 92+6T>C] [37] e rs34690599 [IVS-II-745 (C>G), HBB: c. 316-106C>G] [38], que se referem a substituições nos intrões 1 e 2, respetivamente, interferem também no *splicing*, embora ainda permitam a produção de cadeias de β -globina, resultando assim uma β^+ -talassemia [28], [32], [39]. No entanto, a gravidade da doença pode variar consoante o haplótipo associado, podendo, em alguns casos, manifestar-se de forma mais severa [32].

As mutações rs63749819 [codão 6 (-A), HBB: c.20del] [40] e rs35497102 [codão 8 (-AA), HBB: c-25_del] [41], ambas do tipo *frameshift*, também têm sido identificadas tanto no continente africano como em indivíduos com origens africanas [29], [32]. A mutação rs33959855 [CD 22 (GAA \rightarrow TAA), HBB: c.67G>T] [42], responsável pela introdução de um codão nonsense, foi a principal mutação identificada no já citado estudo desenvolvido no Quênia [23], [32]. No mesmo estudo, reportou-se a mutação rs33941849 [codão de iniciação (ATG \rightarrow ACG), HBB: c.2T > C] [43], que impede o início da tradução ao inativar o local de ligação do tRNA. Todas estas são mutações do tipo que afetam a tradução do mRNA, impedindo totalmente a produção de cadeias de β -globina. Como consequência, os indivíduos portadores destas mutações desenvolvem β^0 -talassemia [28], [39].

Com esta breve revisão verifica-se que há um número reduzido de mutações identificadas na África Subsariana, o que pode refletir a falta de investigação nessa região no âmbito da β -talassemia e ainda sugerir um subdiagnóstico dessa condição genética.

2.2.2.2. Alfa-talassemia

A alfa-talassemia (α -talassemia) é uma das doenças monogénicas mais comuns do mundo. Resulta de mutações nos genes HBA1 e HBA2, localizados no cromossoma 16 e traduz-se na redução ou ausência da síntese das cadeias de alfa globina. Trata-se de

uma condição com uma elevada prevalência, estimando-se que cerca de 5 a 20% da população mundial seja portador de pelo menos uma mutação responsável por α -talassemia [44]. Contudo, em regiões tropicais e subtropicais onde a malária é ou foi endêmica podem ser atingidas frequências mais elevadas de 80-90% [45], [46], [47]. Na África subsariana estima-se que a α -talassemia afete até 50% da população [48].

Atualmente conhecem-se cerca de 130 mutações responsáveis por α -talassemia, sendo que aproximadamente 95% dos casos deste distúrbio são devidos a deleções, enquanto os restantes são atribuídos a mutações pontuais [25], [44], [49].

A α -talassemia provocada por deleções pode ser classificada em α^+ -talassemia e α^0 -talassemia, consoante haja, respetivamente, perda/redução da atividade de um único gene alfa (em hetero ou homozigotia) ou de ambos num mesmo alelo (Figura 2.3). A primeira referida resulta numa expressão clínica mínima, enquanto a segunda se traduz num impacto clínico significativo [44], [50].

A severidade clínica deste distúrbio genético depende do número de genes afetados. A perda funcional de três genes alfa origina a doença de hemoglobina H (HbH) (Figura 2.3), que pode resultar na necessidade de transfusões em períodos de hemólise induzida por stress [44]. A forma mais severa de α -talassemia é a síndrome de hidropsia fetal por hemoglobina de Bart's (Figura 2.3), que ocorre pela ausência total dos quatro genes da alfa globina, que conduz a anemia fetal grave, insuficiência cardíaca, hepatoesplenomegalia e morte *in utero*, caso não sejam realizadas transfusões intrauterinas [25], [44], [47]. Quando ocorre a deleção de apenas um gene de alfa globina, o indivíduo afetado é um portador silencioso, não apresentando alterações clínicas ou laboratoriais, exceto microcitose ligeira, que pode surgir por vezes. Já o traço talassémico diz respeito aos casos em que ocorre a perda de dois genes alfa, verificando-se frequentemente uma leve anemia microcítica [51]. O Quadro 2.1 sumariza as manifestações clínicas em função do genótipo para os genes alfa.

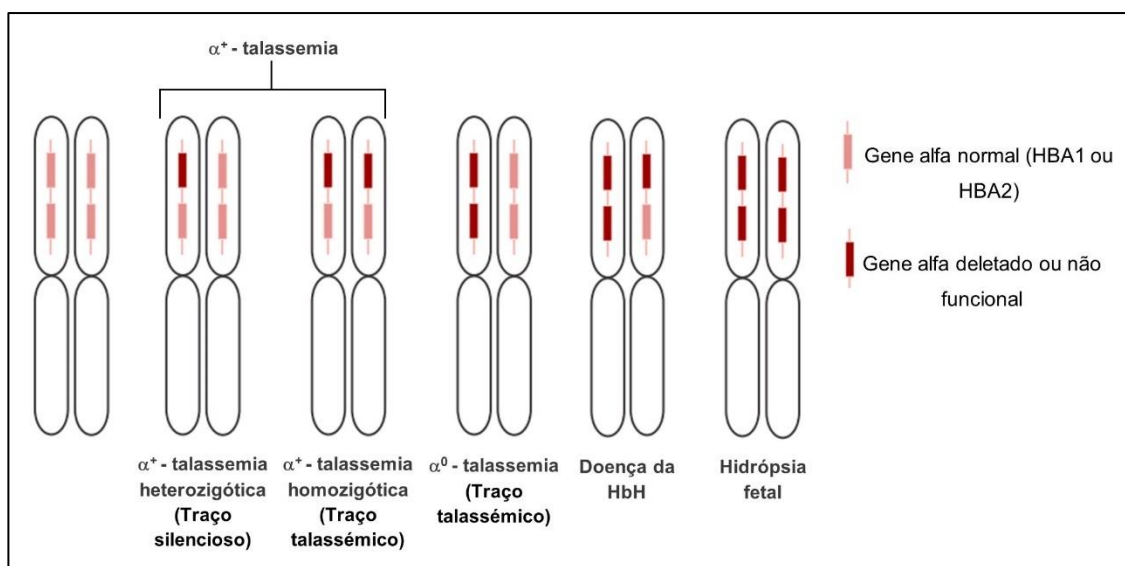


Figura 2.3: Classificação da alfa-talassemia de acordo com o número de genes deletados ou não funcionais. Adaptado de Musallam K. *et al.* (2024) *Blood Reviews* 64 [44].

Quadro 2.1: Designação e manifestações clínico-laboratoriais em função do genótipo para os genes alfa.

Genótipo	Nº de genes α funcionais	Designação	Manifestação clínica/laboratorial
$\alpha\alpha / \alpha\alpha$	4	Genótipo normal	Sem alterações
$-\alpha / \alpha\alpha$	3	Portador silencioso	Normal ou ligeira microcitose
$-\alpha / -\alpha$ ou $-- / \alpha\alpha$	2	Traço alfa-talassêmico	Anemia microcítica hipocrômica leve
$-- / -\alpha$	1	Doença de HbH	Anemia moderada a severa. Hemólise
$-- / --$	0	Hidrôpsia fetal por HB Bart's	Letal <i>in utero</i> ou logo após o parto

A deleção de 3.7 kb ($-\alpha^{3.7}$) constitui-se como a mais comum mutação associada à α^+ -talassemia, sendo amplamente distribuída a nível mundial [52], [53], [54]. Esta deleção apresenta maior prevalência em populações africanas e da região mediterrânica [51], [55].

Os genes HBA1 e HBA2 inserem-se em dois segmentos de 4 kb com uma elevada homologia. Estes segmentos dividem-se em três regiões homólogas mais pequenas, X, Y e Z, que se encontram separadas por regiões não homólogas, as regiões I, II e III. A deleção $-\alpha^{3.7}$ resulta de um evento de recombinação homóloga entre as regiões Z dos genes HBA1 e HBA2, que estão separados por 3.7 kb, originando-se um gene híbrido HBA2/HBA1 (Figura 2.4) e conseqüente perda de um gene alfa funcional [49], [51]. No

Apêndice I encontra-se representada a sequência deletada em consequência da deleção 3.7 kb.

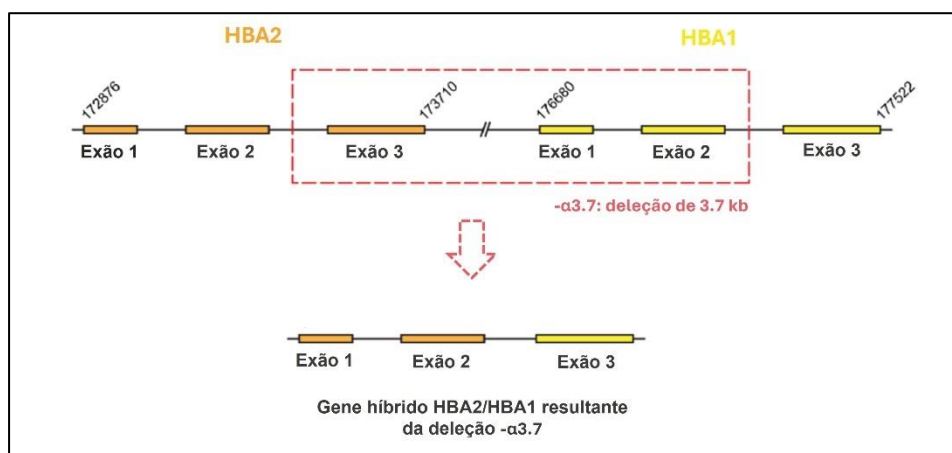


Figura 2.4: Esquema representativo da deleção - $\alpha^{3.7}$, que origina o gene híbrido HBA2/HBA1. A deleção remove o exão 3 do gene HBA2 e os exões 1 e 2 do gene HBA1. Adaptado de Alderei L, *et al.* (2023) *Thalassemia Reports* 14 [54].

2.2.3. Outras Variantes

2.2.3.1. Hemoglobina C (HbC)

A hemoglobina C (rs33930165) [56] consiste numa variante estrutural da hemoglobina, sendo a segunda mais comum em indivíduos de ascendência africana [1], [57]. A presença significativa da HbC em populações africanas está associada à sua ação protetora parcial contra a malária, provocada pelo *Plasmodium falciparum* [58], o que explica a sua alta prevalência em áreas endêmicas da doença, especialmente na África Ocidental [57], [58].

Esta variante é herdada de forma autossômica recessiva e surge devido a uma mutação pontual no gene da cadeia beta da globina (c.19G>A), na qual o ácido glutâmico é substituído por uma lisina na posição 6 da cadeia beta (p. Glu6Lys) [1], [57], [58].

A mutação da qual resulta a HbC provoca uma alteração na carga elétrica da molécula de hemoglobina, que passa a ter uma carga mais positiva do que a hemoglobina normal. Isto traduz-se numa redução da solubilidade da HbC, o que favorece, consequentemente, a formação de cristais no interior dos eritrócitos [58].

Indivíduos heterozigóticos para a HbC são geralmente assintomáticos e não apresentam complicações clínicas relevantes. Já os indivíduos homozigóticos, geralmente apresentam anemia hemolítica crónica leve a moderada. Esta variante também pode ser encontrada em associação com outras variantes, o que pode agravar

o quadro clínico. Por exemplo, quando combinada com a Hbs, surge uma condição caracterizada por anemia hemolítica crónica e crises vaso-oclusivas menos severas e menos frequentes do que nos casos de homozigotia para HbS. Já em associação com β talassemia pode provocar anemia hemolítica moderada com esplenomegalia [1], [57].

2.2.3.2. Hemoglobina G -Philadelphia

A hemoglobina G-Philadelphia (HbG_{Ph}) (rs111033601) [59] é uma variante estrutural da cadeia alfa da hemoglobina, sendo a variante mais comum dessa cadeia na população africana. Tem elevada prevalência na África subsariana e especialmente na África ocidental [30], [60].

Resulta de uma mutação *missense* que se traduz na substituição do aminoácido asparagina (Asn) por uma lisina (Lys) na posição 68 da cadeia alfa globina (α 68 Asn→Lys) [60], [61]. Esta substituição pode surgir de duas formas – através da substituição de uma Citosina (C) por uma Adenina (A) (AAC → AAA) no códon 68 do gene HBA2 (α 2) ou pela substituição de uma Citosina (C) por uma Guanina (G) (AAC → AAG) no gene híbrido α 2 α 1, resultante da deleção 3.7kb, responsável por α -talassemia [60], [62].

A HbG_{Ph} é herdada de forma autossómica codominante, o que leva a que indivíduos heterozigóticos sejam geralmente assintomáticos. Já a homozigotia pode traduzir-se em estados clínicos mais severos, embora seja rara, com uma frequência estimada de 1 em 25 milhões [62]. A HbG_{Ph} surge muitas vezes associada com α -talassemia, o que pode alterar a expressão e concentração da HbG_{Ph} em circulação no sangue [60], [62]. A combinação com outras variantes estruturais de hemoglobina, como a HbC ou HbS, também é um cenário plausível, podendo nalguns casos agravar as manifestações clínicas.

2.3. RASTREIO NEONATAL DE HEMOGLOBINOPATIAS

Como já visto, a ACF é responsável por uma fração significativa das mortes em crianças com idade inferior a 5 anos em países de baixa renda, essencialmente devido à falta de diagnóstico precoce e tratamentos adequados. Muitas destas crianças morrem sem terem chegado a receber o diagnóstico [10]. No entanto, quando seguidas após diagnóstico, a mortalidade reduz significativamente [7], [9], [10].

As principais causas de mortalidade em crianças com idade inferior a 5 anos com ACF incluem infecções bacterianas, como pneumonia, septicemia e meningite, bem como crises vaso-oclusivas, desnutrição e anemia severa, por vezes exacerbada por malária [8], [9], [12], [63].

Vários estudos têm destacado a importância dos rastreios neonatais na prevenção das complicações e consequente diminuição da mortalidade [7], [8], [10], [64]. Este tipo de rastreio tem sido implementado com sucesso em inúmeros contextos globais [8], [12], [64].

No que diz respeito aos países desenvolvidos, foi em 1973 que os Estados Unidos da América (EUA) deram o primeiro passo no rastreio neonatal de ACF, no entanto, foi apenas em 2006 que o rastreio foi implementado a nível nacional, assegurando que todos os recém-nascidos no país fossem testados como parte de um programa universal [65]. Na Europa, foi há cerca de 40 anos que surgiram os primeiros rastreios neonatais de ACF em França e no Reino Unido, tendo estes mais tarde evoluído para programas nacionais de sucesso comprovado. A implementação dos referidos programas traduziu-se em taxas de sobrevivência de 99% aos 16 anos, no Reino Unido, e de 97,1% em França [7].

Já em países em desenvolvimento, os programas de rastreio têm enfrentado alguns obstáculos, uma vez que a falta de estruturas de saúde organizadas e o elevado custo dos programas limitam a implementação de modelos semelhantes aos de países desenvolvidos [7], [66].

A Sociedade Americana de Hematologia fundou o Consórcio para Rastreio Neonatal em África (CONSA), que consiste numa rede internacional que preconiza demonstrar os benefícios do rastreio neonatal e das consequentes intervenções precoces em crianças com ACF na África Subsaariana. O CONSA baseia-se na premissa de que a deteção precoce de recém-nascidos com ACF e o acesso a cuidados de saúde adequados pode reduzir a mortalidade infantil em menores de 5 anos. Esta iniciativa abrange sete países – Quênia, Gana, Libéria, Nigéria, Tanzânia, Zâmbia e Uganda – e tem então como intuito implementar um programa padronizado de rastreio de hemoglobinopatias e cuidados contínuos após o diagnóstico [16], [45].

Embora já tenham vindo a ser desenvolvidos programas piloto de rastreio neonatal pelos membros do CONSA e por outros países não membros, ainda nenhum dos países estabeleceu um programa nacional de rastreio. Isto é justificado pela escassez de recursos e pela falta de apoio das entidades políticas [8], [67]. Contudo, apesar das

dificuldades, vários programas de rastreio têm vindo a apresentar resultados promissores.

O Gana é, provavelmente, o país africano mais avançado no que toca ao rastreio neonatal de ACF. Em 1995 surge um programa de rastreio como parte de um projeto financiado pelo *National Institutes of Health*, que testou, durante os 10 anos seguintes, 202 244 recém-nascidos em várias unidades de saúde rurais e urbanas na região de Ashanti. Os resultados demonstraram que cerca de 1 em cada 50 bebés no Gana nasce com ACF. Não obstante estes resultados alarmantes, ainda não se deu a implementação de um programa de rastreio neonatal nacional [68]. Mais recentemente, em 2017, foi desenvolvido um programa de rastreio [69] no maior hospital público do Gana (*Korle Bu Teaching Hospital*), com o principal objetivo de avaliar a exequibilidade e os desafios da implementação de um programa de rastreio neonatal nacional. Apesar dos desafios encontrados, como a falta de profissionais e de material e o atraso nos resultados, foi possível adotar estratégias que melhoraram substancialmente a cobertura do rastreio. Este estudo revelou que, embora haja dificuldades, é possível implementar programas de rastreio neonatal de ACF em cenários de recursos limitados, o que abre portas para o início da concretização de programas nacionais.

Benim foi outro dos pioneiros no rastreio neonatal de ACF na África Subariana, tendo levado a cabo, em 1993, um programa de rastreio neonatal que testou, até 1998, 943 recém-nascidos através de Focagem Isoelétrica e eletroforese das hemoglobinas para confirmação de resultados anormais. Este programa de rastreio neonatal traduziu-se numa redução significativa na gravidade das complicações e na mortalidade infantil associada à ACF, sendo que, apesar das dificuldades em rastrear e motivar as famílias e da resistência inicial, os pais dos bebés apresentaram elevada adesão ao programa e aos cuidados recomendados [66].

Na República Democrática do Congo, um projeto pioneiro na região testou 31 204 recém-nascidos, também recorrendo à técnica de Focagem Isoelétrica, tendo comprovado a viabilidade da implementação do programa em larga escala, embora tenha, à semelhança do caso de Benin, enfrentado inúmeros desafios logísticos e culturais [9].

Entre fevereiro de 2017 e maio de 2018, no âmbito de um programa de rastreio neonatal na Tanzânia foram testadas amostras de sangue de 17 200 bebés destinadas ao rastreio de HIV. As amostras foram testadas utilizando Focagem Isoelétrica para identificar variantes de hemoglobina, nomeadamente a hemoglobina S. Este programa demonstrou uma prevalência de ACF cerca de duas vezes superior aos dados

previamente reportados, indicando um subdiagnóstico da doença, o que reforça a importância de rastreios neonatais abrangentes [70].

Em 2011, deu-se início a um programa de rastreio em Luanda, Angola, que testou 36 453 recém-nascidos e permitiu uma redução da mortalidade infantil para 6.8% no primeiro ano em crianças com ACF, percentagem esta mais favorável em relação à taxa de mortalidade infantil nacional de 9.8%. Neste programa, as amostras foram analisadas por Focagem Isoelétrica e confirmadas por eletroforese capilar. Apesar das dificuldades em rastrear todas as famílias devido a números de telefone incorretos ou desatualizados, verificou-se uma elevada adesão ao tratamento e às consultas após o contacto inicial. A implementação deste programa de rastreio e os seus resultados positivos comprovaram a exequibilidade deste tipo de iniciativas de saúde pública mesmo em contextos de recursos limitados [10]. A viabilidade deste programa foi ainda salientada por Mc Gann *et al.*, que demonstraram, de acordo com os critérios da Organização Mundial de Saúde (OMS), a elevada relação custo-benefício do programa em todos os cenários de Angola [11].

O sucesso dos vários programas de rastreio desenvolvidos ao longo dos anos tem dependido da utilização de várias tecnologias, como a Focagem Isoelétrica, que é comumente usada em países em desenvolvimento, como comprovado pelos exemplos supracitados, e a Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC), que é mais utilizada em países desenvolvidos, devido aos seus custos elevados [7]. As tecnologias de *Point of Care* (POC) têm vindo a ser vastamente aplicadas em países pouco desenvolvidos, que enfrentam desafios económicos. Pode ser mencionado, a título exemplificativo, um estudo realizado no Haiti, no qual foram testados 8224 recém-nascidos, recorrendo a testes de POC, o que permitiu aumentar significativamente as taxas de seguimento em áreas rurais. Este estudo, apesar dos desafios enfrentados, como problemas logísticos e barreiras sociais, demonstrou, mais uma vez, a viabilidade de programas de rastreio [63].

Apesar dos avanços no âmbito do rastreio neonatal em países em desenvolvimento, as dificuldades enfrentadas são idênticas nos vários países. Problemas como a falta de infraestrutura adequada, o elevado custo dos programas, a dificuldade na consciencialização e na rastreabilidade das famílias são obstáculos comuns.

Os resultados dos inúmeros programas implementados nas várias regiões do mundo têm, não só enfatizado as elevadas prevalências de ACF mas também revelado que os rastreios neonatais têm o potencial de transformar os cuidados de saúde [7]. Ao permitir um diagnóstico precoce, estes programas possibilitam intervenções também elas

precoces e eficazes, nomeadamente a vacinação, profilaxia antibiótica com penicilina, suplementação com ácido fólico e a introdução de hidroxureia para reduzir crises vaso-oclusivas [7], [8], [9], [10], [63], [70]. Assim, os rastreios neonatais têm um elevado potencial na diminuição da mortalidade associada à ACF.

Contudo, de forma a reduzir a carga global da ACF e diminuir as desigualdades em saúde, é essencial garantir a sustentabilidade deste tipo de programas [7]. Para isso é importante investir em parcerias público-privadas, reforçar o uso de tecnologias acessíveis e integrar e associar os rastreios com outras iniciativas de saúde, como os programas de imunização e o rastreio de HIV [12].

A ACF, apesar da sua elevada importância, não é a única hemoglobinopatia que merece destaque. Assim, outras hemoglobinopatias, como as talassemias ou outras variantes estruturais de hemoglobina devem ser consideradas. Estas podem traduzir-se em complicações graves, podendo, sem diagnóstico e tratamento adequados, ter um elevado impacto na qualidade de vida dos seus portadores. Desta forma, tal como no caso da ACF, os programas de rastreio são cruciais para o diagnóstico precoce.

O rastreio das talassemias, que resultam em anemias de severidade variável, tem vindo a ser discutido em vários contextos geográficos. Países endémicos, como o Chipre e a Grécia, têm priorizado programas pré-nupciais e pré-natais em detrimento dos rastreios neonatais, o que tem resultado numa redução significativa da incidência de recém-nascidos afetados [71]. Este tipo de programas tem vindo a ser incentivado, desde a década de 1970, pela OMS, devido ao impacto negativo da doença e aos elevados custos associados ao tratamento de longo prazo. Já em países não endémicos, como os EUA e o Reino Unido, as talassemias têm sido incluídas em programas de rastreio neonatal para doenças raras, o que permite uma identificação precoce e uma consequente gestão clínica mais eficaz [72].

Em África, continente no qual se detetam cerca de 70% de todos os casos de hemoglobinopatias globais, destacam-se, dentre as hemoglobinopatias com significado clínico encontradas, além da ACF, as talassemias e a hemoglobina C. O desenvolvimento de programas de rastreio focados na ACF tem permitido, por vezes, detetar estas outras variantes, permitindo aos doentes receber diagnóstico precoce e acompanhamento clínico adequado, o que contribui para reduzir complicações [67]. No entanto, permanece a necessidade de criar programas de rastreio abrangentes, com boa cobertura populacional.

2.4. METODOLOGIAS LABORATORIAIS PARA INVESTIGAÇÃO DE HEMOGLOBINOPATIAS

2.4.1. Focagem Isoelétrica

A Focagem Isoelétrica (IEF) é uma das metodologias eletroforéticas usadas no diagnóstico e rastreio de hemoglobinopatias. Esta consiste numa técnica que permite a separação de proteínas com base no seu ponto isoelétrico (PI), correspondendo este ao valor de pH no qual a proteína atinge uma carga elétrica neutra [19].

Na IEF é utilizada uma matriz, geralmente um gel de agarose ou poliacrilamida, que contém anfólitos de baixo peso molecular com diferentes pontos isoelétricos (PIs). Quando é aplicada uma elevada tensão elétrica é originado um gradiente de pH, dado que cada anfólito migra até atingir o seu PI [1], [19], [72].

No âmbito da análise de variantes de hemoglobina, quando uma amostra contendo hemoglobina é aplicada no gel, cada variante presente na amostra migra no sentido do cátodo até ao ânodo até alcançar o seu PI, precipitando nesse mesmo ponto, o que origina a formação de bandas visíveis [19], [73]. Para este tipo de análise em específico é geralmente usado um gradiente de pH que varia entre 6 e 8 [1]. A identificação das bandas é feita através da comparação dos padrões de migração com controlos de qualidade conhecidos [73] e através do uso de *guidelines* publicadas [74]. Na Figura 2.5 encontra-se uma representação das mobilidades relativas de inúmeras hemoglobinas variantes, o que é útil para a comparação dos padrões de bandas obtidos laboratorialmente.

A IEF permite uma separação eficiente das hemoglobinas, apresentando maior resolução, sensibilidade e precisão relativamente à eletroforese em pH alcalino [19], [73]. Quanto à ordem de migração das hemoglobinas, esta é idêntica à que se observa na eletroforese alcalina. No entanto, a IEF possui uma maior capacidade de deteção de variantes de hemoglobina. Outro aspeto que torna a IEF bastante vantajosa é o seu custo relativamente baixo [74].

São vários os tipos de hemoglobinas que podem ser identificados e diferenciados através da IEF, nomeadamente a HbA, HbF, HbS, HbE, HbOArab, HbDPunjab, HbG e HbBart's, embora algumas delas necessitem de ser confirmadas através de outros métodos, devido ao facto de haver várias variantes a migrar na mesma zona. Em amostras de recém-nascidos, é ainda evidenciada a hemoglobina F acetilada, que aparece ligeiramente acima da HbA, ou seja, mais perto do ânodo [19], [73], [74].

Os padrões de migração das hemoglobinas obtidos por IEF são fundamentais para a identificação das diferentes hemoglobinopatias, sendo que a interpretação desses padrões é baseada na presença e na combinação das várias bandas. O Quadro 3.1 apresenta as principais hemoglobinopatias e os respectivos padrões de IEF nos recém-nascidos.

Relativamente às limitações desta técnica, é de realçar o facto de separar derivados pós-traducionais das proteínas da hemoglobina, dificultando a interpretação dos resultados [1], [72], [74]. Esta metodologia exige ainda muito trabalho laboratorial e tempo [73]. Além disso, os resultados anormais, ou seja, com a presença de hemoglobinas variantes, necessitam de ser confirmados com métodos de segunda linha, como os métodos moleculares [1], [74].

A IEF é uma metodologia adequada para a análise de vários tipos de amostras, nomeadamente de hemolisados, amostras de sangue total e ainda amostras de sangue seco em papel de filtro.

As amostras de sangue seco permitem uma fácil recolha, transporte e armazenamento, sendo adequadas quando não há a possibilidade da sua expedição imediata até ao laboratório, ou quando precisam de percorrer longas distâncias até lá chegar [1]. Desta forma, as amostras de sangue seco são especialmente úteis no contexto do diagnóstico de hemoglobinopatias em regiões com recursos limitados, como por exemplo em países africanos, nos quais os programas de rastreio abrangem populações geograficamente dispersas e com acesso limitado a infraestruturas laboratoriais. Além disso, a colheita exige um reduzido volume de sangue, o que torna esta modalidade ideal para rastreios neonatais de ACF e outras hemoglobinopatias [1], [19].

De forma geral, o procedimento para a análise de amostras de sangue seco em papel de filtro consiste na imersão do papel numa solução tampão, o que permite que a hemoglobina se liberte do papel de filtro, passando a estar em solução. Esta solução contendo a hemoglobina é pipetada para um poço do gel, que possui um gradiente de pH. Por fim, é aplicada uma corrente elétrica, migrando as hemoglobinas, como visto, até atingirem o seu PI.

Quadro 2.2: Padrão eletroforético da IEF em função do genótipo

Hemoglobinopatia	Bandas observadas na IEF
HbS/HbS	FS
HbA/HbS	FAZ
HbS/ β^0 -talassemia	FS
HbS/ β^+ -talassemia	FAZ
HbS/HbC	FSC
HbA/HbC	FAC
HbS/outra variante β	FSX $_{\beta}$
HbA/variante β	FAX $_{\beta}$
β^0 -talassemia	F
β^+ -talassemia	FA
Hb variante β / Hb variante β	FX $_{\beta}$
HbA/variante α	FF $_{\alpha}$ AX $_{\alpha}$
HbS/variante α	F F $_{\alpha}$ A X $_{\alpha}$ SS $_{\alpha}$
Hb variante α / Hb variante α	F $_{\alpha}$ X $_{\alpha}$

X $_{\beta}$ = variante beta; X $_{\alpha}$ = variante alfa; F $_{\alpha}$ = HbF com cadeia alfa mutada; S $_{\alpha}$ = HbS com cadeia alfa mutada

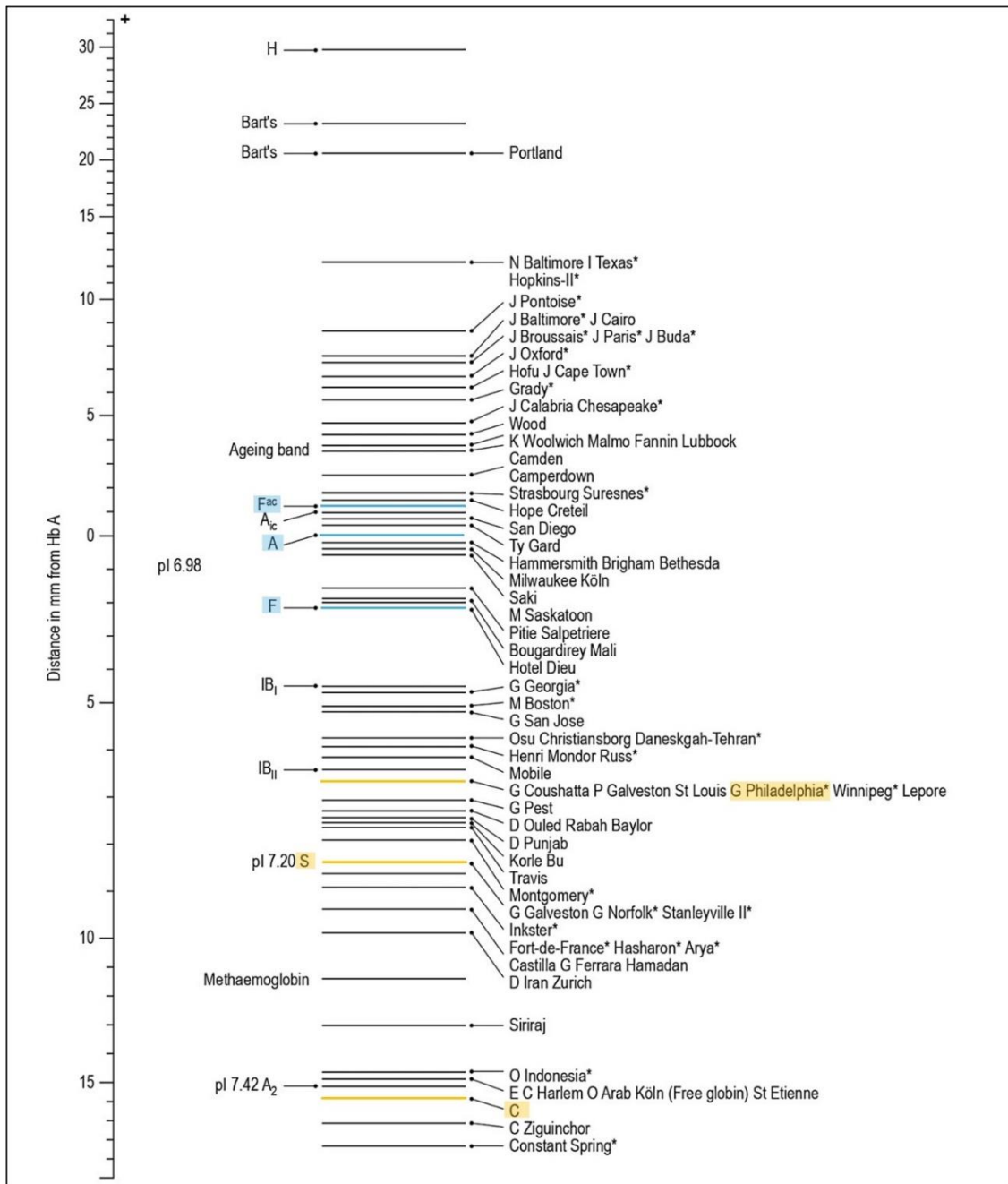


Figura 2.5: Mobilidade relativa de várias variantes de hemoglobina em Focagem Isoelétrica. As variantes de Hgb mencionadas no capítulo 2.2 encontram-se destacadas a cor de laranja. As Hb realçadas com a cor azul são as expectáveis de encontrar numa IEF de uma amostra neonatal normal. Adaptado de Bain, Barbara J. *et al.*, 2011 [3].

2.4.2. Cromatografia Líquida de Alta Performance

A Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC) consiste numa técnica vastamente aplicada no diagnóstico laboratorial das hemoglobinopatias. Trata-se de um método cromatográfico de alta resolução que se baseia na separação entre uma fase móvel líquida e uma fase estacionária sólida [2], [75]. Esta é uma metodologia aplicada a várias categorias de substâncias, nomeadamente vitaminas, corantes sintéticos, pigmentos naturais, contaminantes, aminoácidos, lípidos e carboidratos [75]. A HPLC pode ser classificada em várias categorias dependendo da fase estacionária utilizada: HPLC por adsorção, partição, troca iónica e ainda por exclusão de tamanho [75], [76].

A HPLC é particularmente eficaz na identificação e quantificação de hemoglobinas normais e variantes, nomeadamente no âmbito de rastreios, dado que possui elevadas sensibilidade e capacidade de processamento de um grande número de amostras com fiabilidade e rapidez [2], [77], [78].

No contexto específico em estudo, o diagnóstico de hemoglobinopatias, a HPLC é geralmente utilizada na sua configuração de troca catiónica, na qual as hemoglobinas (carga positiva), são adsorvidas à fase estacionária (carga negativa) presente numa coluna de cromatografia, sendo posteriormente eluídas por uma fase móvel com concentração crescente de catiões, que competem pelos sítios de ligação. A separação é, portanto, baseada na afinidade relativa de cada variante de hemoglobina com a fase estacionária, o que resulta em diferentes tempos de retenção. Os vários tipos de hemoglobinas, quer as normais como as variantes possuem cargas diferente, o que lhes permite ser identificadas por esta metodologia. Quanto mais positivamente carregadas estiverem as hemoglobinas, maior será o tempo de retenção [2], [75], [76]. Através desta metodologia de separação, as hemoglobinas podem ser detetadas no eluído por fotometria a dois comprimentos de onda e presuntivamente identificadas através do seu tempo de retenção. A quantificação é realizada através da utilização de *softwares* específicos para o efeito, que medem os picos do cromatograma gerado [2], [75]. O funcionamento básico da HPLC encontra-se ilustrado na Figura 2.6.

Uma das principais vantagens da HPLC em relação a métodos clássicos, como a eletroforese, reside na sua capacidade de processamento de grandes volumes de amostras de forma automatizada. Além disso, são requeridos baixos volumes de sangue (cerca de 5µl) o que a torna útil em programas de rastreio neonatal.

A HPLC fornece resultados semiquantitativos e tem a capacidade de detetar simultaneamente vários tipos de hemoglobina, incluindo as mais comuns, como HbA,

A2, F, S e C, bem como algumas variantes menos comuns, mas igualmente relevantes, como Hb D-Punjab e G-Philadelphia [2], [76], [77].

Não obstante as suas vantagens, a HPLC também apresenta limitações, nomeadamente o facto de algumas variantes como a HbE ou a Hb Lepore poderem coeluir com a Hb A2, o que torna mais complexa a identificação inequívoca destes tipos de hemoglobina. Além disso, existem inúmeras variantes de hemoglobina que podem apresentar tempos de retenção sobrepostos, o que significa que a HPLC não deve ser usada de forma isolada para fornecer diagnósticos definitivos, devendo ser complementada com outras técnicas eletroforéticas e moleculares [2], [76].

Posto isto, a HPLC é uma metodologia sensível e eficiente para a identificação e quantificação de hemoglobinas variantes, tendo especial relevância em contextos clínicos e programas de saúde pública direccionados para a prevenção de hemoglobinopatias. Dadas as suas vantagens deveria ser, idealmente, aplicada no âmbito de rastreios neonatais e populacionais, embora a sua implementação em contextos de baixos recursos, como em muitos países africanos de baixa renda, possa ser limitada por fatores como o custo dos equipamentos, reagentes e manutenções [2], [76], [78].

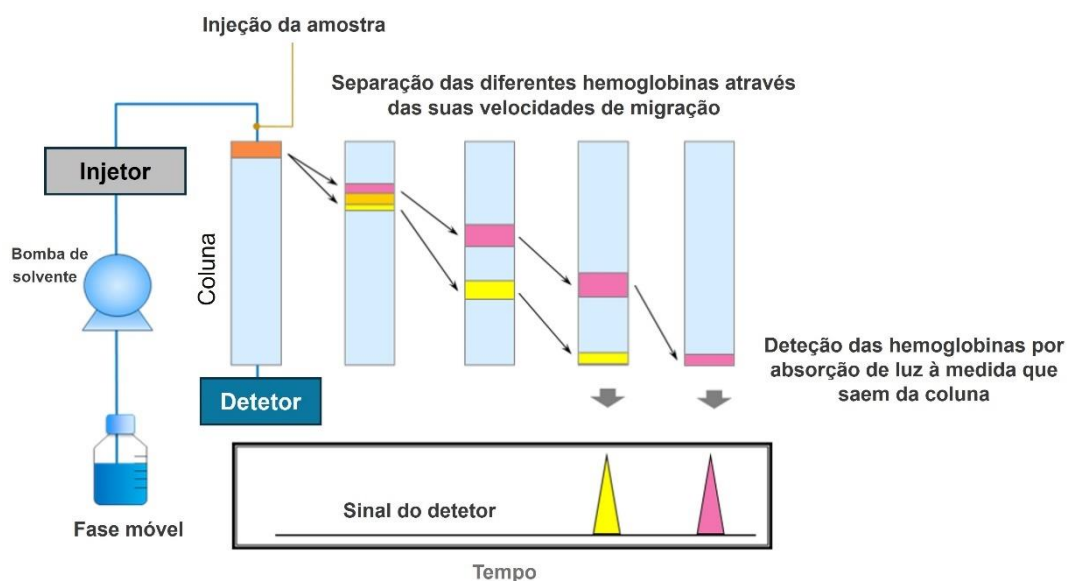


Figura 2.6: Esquema representativo do processo de HPLC para separação de hemoglobinas. A amostra é injetada no sistema, é transportada pela fase móvel através da coluna cromatográfica e as hemoglobinas são separadas com base no seu tempo de retenção. À medida que saem da coluna são detetadas por absorção de luz, gerando um cromatograma com picos específicos para cada hemoglobina. Adaptado de: *Shimadzu Corporation* [79].

2.4.2. Eletroforese Capilar

A Eletroforese Capilar (EC) é outra das metodologias bastante utilizadas na investigação de hemoglobinopatias, permitindo a quantificação das variantes de hemoglobina. Esta técnica destaca-se pela elevada sensibilidade, rapidez e ainda pelo facto de possuir um elevado grau de automação. Segue o princípio dos métodos eletroforéticos, no qual as frações de hemoglobina são separadas com base na sua mobilidade em tampão alcalino (pH 9,4), utilizando um capilar de sílica com 25-100 μm de diâmetro [73], [80]. Assim, ao contrário das eletroforeses em gel ou em acetato de celulose, na EC, é usado um meio de suporte líquido – o tampão alcalino.

O processo envolve, numa primeira fase, a lise dos eritrócitos nas amostras de sangue, que são, numa segunda fase, injetadas no extremo anódico do capilar de sílica. Após a aplicação de uma corrente elétrica, as frações de hemoglobina migram a diferentes velocidades para o cátodo, sendo a deteção ótica realizada a 415 nm [73], [81]. O interior do tubo capilar, por ter sílica, possui cargas negativas na sua superfície. Essas cargas negativas interagem com os iões positivos da solução de tampão alcalina, formando duas camadas elétricas – uma fixa, composta pelas cargas negativas na parede do capilar, e uma móvel, composta pelos iões positivos da solução, que se deslocam em direção ao cátodo sob influência do campo elétrico. Este movimento leva à formação de um fluxo de líquido no interior do capilar (fluxo eletroendosmótico). Simultaneamente, cada molécula da amostra, nomeadamente as hemoglobinas, tem uma mobilidade eletroforética característica, ou seja, as moléculas negativas tendem a mover-se em direção ao ânodo e as positivas para o cátodo. Contudo, o fluxo eletroendosmótico é mais intenso do que a força do campo elétrico sobre as moléculas, pelo que essas são levadas até ao detetor no cátodo. A separação das hemoglobinas ocorre então em função da carga elétrica das moléculas e do fluxo eletroendosmótico, resultando na formação de picos específicos num eletroferograma. É este equilíbrio entre o fluxoeletrosmótico e a mobilidade eletroforética das moléculas, por vezes em sentidos opostos, que permite uma separação eficiente e de elevada resolução entre os diferentes componentes da amostra [2]. Na Figura 2.7 encontra-se uma representação deste processo. A posterior análise do eletroferograma permite a identificação das diferentes frações, bem como a sua quantificação, o que se traduz num dos principais pontos fortes desta técnica [73], [81].

A EC é especialmente eficaz na deteção de variantes presentes em baixa concentração. Uma das principais vantagens relativamente à Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC) está relacionada com a sua capacidade para separar e quantificar

HbA₂, mesmo na presença de HbE, que noutras técnicas eletroforéticas migra perto da HbA₂ [73], [73]. Apresenta uma tecnologia mais avançada e com melhor resolução do que outros métodos eletroforéticos, como as eletroforeses em pH ácido e alcalino e a Focagem Isoelétrica [2].

Além disso, consiste numa técnica automatizada e permite a análise em paralelo de múltiplas amostras, constituindo-se como uma opção adequada para aplicação no âmbito os rastreios populacionais e ambientes laboratoriais com elevado volume de amostras [73].

Por outro lado, como qualquer outra metodologia, a EC também apresenta limitações, nomeadamente o facto de os picos da HbC e HbA₂ surgirem sobrepostos, não sendo possível a quantificação da HbC. Assim, a EC, à semelhança das restantes técnicas, não consegue identificar todos os tipos de hemoglobina, devendo ser complementada com métodos moleculares, HPLC ou testes de solubilidade para permitir a identificação precisa das variantes [81], [82].

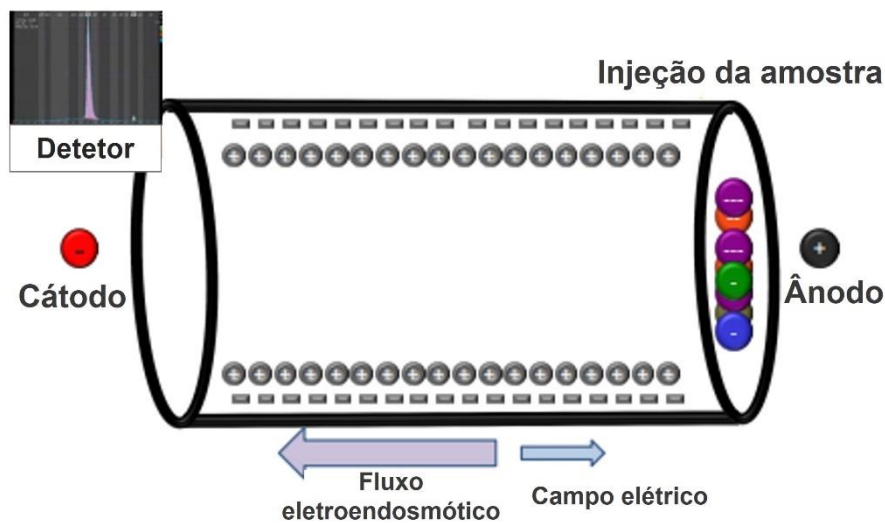


Figura 2.7: Esquema representativo do processo de Eletroforese Capilar para separação de hemoglobinas. A amostra é injetada num capilar de sílica preenchido por um tampão alcalino e é submetida a um campo elétrico. O fluxoeletroosmótico move as moléculas em direção ao cátodo. As hemoglobinas migram a velocidades distintas e são detetadas por absorção de luz ao alcançarem o detector, gerando um eletroferograma. Adaptado de: *Association of Public Health Laboratories*, 2015 [73].

2.4.3. *Polymerase Chain Reaction (PCR)*

A técnica de *Polymerase Chain Reaction*, ou PCR, é uma técnica molecular essencial, estando na base, ou sendo um pré-requisito, de outras metodologias cruciais, como o PCR – RFLP, o Gap-PCR ou a sequenciação de Sanger, abordados mais à frente.

A PCR consiste numa técnica que permite a amplificação de uma sequência específica de DNA (Ácido Desoxirribonucleico) a partir de uma quantidade reduzida de material genético [83]. A sua elevada sensibilidade torna-a numa metodologia viável para o uso no contexto de rastreios neonatais, nos quais é frequentemente usado sangue seco em papel de filtro, o qual contém reduzidas concentrações de DNA [73].

O princípio da técnica baseia-se na amplificação de uma região de interesse do DNA, utilizando ciclos repetidos de variações de temperatura. O processo é baseado, então, em ciclos térmicos que envolvem três etapas principais: (1) desnaturação do DNA (através da temperatura, geralmente $>90^{\circ}\text{C}$), que consiste na separação das duas cadeias; (2) hibridação, durante a qual sequências específicas de DNA complementares à região-alvo, designadas por *primers*, se ligam ao DNA molde; (3) extensão, durante a qual, uma enzima DNA polimerase sintetiza novas cadeias de DNA complementares. Este ciclo é repetido geralmente entre 25 e 35 vezes, ocorrendo uma duplicação da quantidade de DNA a cada ciclo, o que resulta na obtenção de milhares de cópias do DNA alvo [84], [85]. O processo é realizado num equipamento designado por termociclador, que permite o controlo do número de ciclos, bem como das temperaturas de cada etapa [84].

Os principais componentes requeridos para realização da PCR são o DNA molde, *primers* específicos para a região a amplificar, nucleótidos (A, T, C e G), e uma enzima DNA polimerase termoestável, como a Taq Polimerase, por exemplo [85].

Anteriormente à realização da técnica de PCR propriamente dita, é necessária a extração do DNA da amostra em estudo, o que pode ser feito através de vários métodos como métodos de ebulição, a lise alcalina, o uso de resina Chelex, a extração com fenol-clorofórmio ou ainda métodos comerciais [73].

No âmbito do diagnóstico de hemoglobinopatias, a técnica de PCR enfrenta alguns desafios técnicos. Enquanto a amplificação do gene da β -globina tende a ser relativamente simples, os genes da α -globina, HBA1 e HBA2, apresentam particularidades que dificultam o processo. Esses genes apresentam um elevado conteúdo GC, o que aumenta a estabilidade da dupla hélice de DNA, dificultando a sua desnaturação. Além disso, regiões ricas em GC são propensas à formação de estruturas

secundárias, como “*hairpins*”, que podem dificultar ou impedir a ligação dos *primers* e ainda interferir com a atividade da DNA polimerase. Aos obstáculos já referidos acrescenta-se o facto de os genes HBA1 e HBA2 possuírem uma homologia superior a 96%, o que dificulta o desenho de *primers* específicos para o gene a amplificar e aumenta significativamente o risco de falhas na amplificação [73].

De forma a garantir a fiabilidade dos resultados, cada ensaio de PCR deve incluir controlos positivos e negativos, que permitem, respetivamente, confirmar que a reação se deu corretamente e detetar possíveis contaminações.

2.4.4. PCR- Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR – RFLP)

A técnica molecular PCR-RFLP, do inglês *Polymerase Chain Reaction – Restriction Fragment Length Polymorphism*, consiste numa metodologia bastante utilizada para a genotipagem de polimorfismos de nucleótido único (SNPs) e identificação de mutações específicas.

O PCR-RFLP baseia-se no uso de enzimas de restrição que reconhecem o alelo mutado ou o alelo normal [24], [73]. Isto significa que as enzimas usadas reconhecem e hidrolisam sequências específicas de nucleótidos. Caso se esteja perante a presença de uma mutação, como um SNP, que afete esse local de reconhecimento, a enzima não irá conseguir hidrolisar, o que alterará, conseqüentemente, o padrão dos fragmentos de DNA produzido. Esses mesmos fragmentos são separados por eletroforese em gel, o que permite a distinção entre alelos normais e mutados [86].

De forma geral, o procedimento associado a esta metodologia consiste na extração do DNA e posterior amplificação por PCR. Concluída a amplificação, o produto do PCR é incubado com uma enzima de restrição adequada à mutação em estudo. Da digestão enzimática resultam fragmentos que, quando separados por eletroforese, demonstram padrões distintos consoante o genótipo da amostra em estudo [73].

Esta é uma metodologia muito utilizada, por exemplo, para a identificação da mutação responsável pela HbS, que remove o local de reconhecimento de várias enzimas de restrição, como a *MstII*, a *Ddel* ou a *Bsu36I* [24], [87].

O PCR-RFLP destaca-se pelo seu baixo custo e facilidade de execução e interpretação, sendo apropriado para laboratórios com recursos limitados. Porém, é uma técnica de baixo rendimento, dado que envolve várias etapas manuais. Quanto às suas limitações, é importante ter em conta o risco de digestão incompleta, o que pode levar a

interpretações erradas, como por exemplo o diagnóstico erróneo de um heterozigótico como sendo homozigótico. Posto isto, a inclusão de controlos positivos de genótipos conhecidos é crucial [73].

2.4.5. Gap-PCR:

O Gap-PCR é uma técnica utilizada para a deteção de mutações causadas por deleções conhecidas, sendo vastamente usada no diagnóstico molecular de hemoglobinopatias [88]. Consiste num método rápido, de baixo custo e eficaz para a identificação das deleções mais comumente associadas a doenças como a alfa e beta-talassemia, o que demonstra a sua utilidade no rastreio de hemoglobinopatias [88], [89]. Além disso, muitas das mutações responsáveis pela alfa-talassemia são demasiado grandes para serem detetadas por sequenciação, situações nas quais o Gap-PCR é uma mais-valia [73]. Esta técnica é particularmente útil na deteção das deleções mais comuns de α -talassemia, como a $-\alpha^{3.7\text{kb}}$ e $-\alpha^{4.2\text{kb}}$ [71], [88], [89].

O Gap-PCR baseia-se na utilização de três *primers*, dois externos, que flanqueiam a deleção em estudo, e um terceiro interno que se localiza dentro da região deletada. Em indivíduos normais, sem deleção, os *primers* externos estão demasiado afastados para permitir a amplificação do fragmento. Nesta situação apenas o *primer* interno e um dos externos estão suficientemente próximos para produzir um produto de amplificação. Já na presença da deleção, a região complementar ao *primer* interno é removida, impedindo a amplificação com esse *primer*. No entanto, a distância entre os *primers* que flanqueiam a deleção diminui, permitindo a amplificação do fragmento de DNA, originando-se um produto de PCR com um tamanho específico [1], [24], [25], [88]. Os tamanhos dos fragmentos amplificados são analisados através de eletroforese em gel, permitindo assim a interpretação do genótipo do indivíduo.

A principal vantagem do Gap-PCR prende-se com o facto de ser um método rápido, barato e eficiente para detetar grandes deleções [89]. Contudo, o seu uso requer que a mutação alvo esteja previamente caracterizada bem como a correta otimização e validação dos protocolos.

2.4.6. Sequenciação de Sanger

A sequenciação de Sanger foi desenvolvida em 1977 por Frederik Sanger, tratando-se da técnica de sequenciação de DNA mais amplamente utilizada [90].

Esta técnica baseia-se na síntese de DNA a partir de um molde previamente amplificado por PCR. É utilizada uma DNA polimerase, os quatro desoxinucleótidos (dNTPs) - dATP, dCTP, dGTP e dTTP -, bem como uma mistura de didesoxinucleótidos (ddNTPs), sendo que estes últimos, pelo facto de não possuírem o grupo hidroxilo na posição 3', levam à interrupção da extensão da cadeia de DNA, quando incorporados na mesma [1], [73], [90]. A identificação da base onde ocorreu a terminação da cadeia é possível devido ao facto de cada ddNTPs ser marcado com um fluoróforo específico. Durante o ciclo de sequenciação são produzidos milhares de fragmentos de DNA, que diferem entre si por apenas uma base. Estes fragmentos são posteriormente separados por eletroforese capilar, sendo detetados através de um sistema ótico que regista a fluorescência emitida por cada ddNTP à medida que passam por um laser. A ordem pela qual os fragmentos passam é registada, o que permite a reconstrução da sequência de DNA original [1], [73], [91]. Desta forma, o resultado final consiste numa leitura direta da sequência nucleotídica, analisada por um software específico, que permite a identificação de qualquer alteração no fragmento alvo [1], [88]. A Figura 2.8 ilustra o funcionamento descrito desta técnica molecular.

A sequenciação de Sanger permite não só a identificação de mutações comuns e conhecidas, como também de mutações raras e até desconhecidas, sendo considerado um método *gold standard* [89], [91]. Esta técnica molecular é de uma grande relevância para o diagnóstico molecular das hemoglobinopatias, especialmente de β -talassemia e das variantes estruturais da hemoglobina. Relativamente ao diagnóstico de β -talassemia, a sequenciação do gene HBB é vastamente utilizada, dado que a maior parte das mutações responsáveis pela doença consistem em mutações pontuais [72], [73]. Esta abordagem é especialmente útil no diagnóstico pré-natal, dada a possível diversidade de mutações entre as populações em estudo [1]. No caso de α -talassemia não deletional, Sanger é o método mais apropriado para a deteção de mutações, evitando a necessidade de realizar vários testes específicos para cada mutação [25], [91]. Não obstante, a maioria das α -talassemias resulta de grandes deleções, as quais não são detetadas por esta metodologia. Por isso, a sequenciação deve ser usada como complemento a outras técnicas, como o gap-PCR [72], [73].

Para além das talassemias, a sequenciação de Sanger desempenha um papel fundamental na identificação de variantes estruturais da hemoglobina, como a HbS ou HbC causadas por mutações que conduzem à substituição de aminoácidos nas cadeias de globina [92].

Posto isto, a elevada precisão e capacidade de identificar mutações pontuais, pequenas inserções e deleções, tornam a sequenciação de Sanger importante no contexto do diagnóstico de hemoglobinopatias.

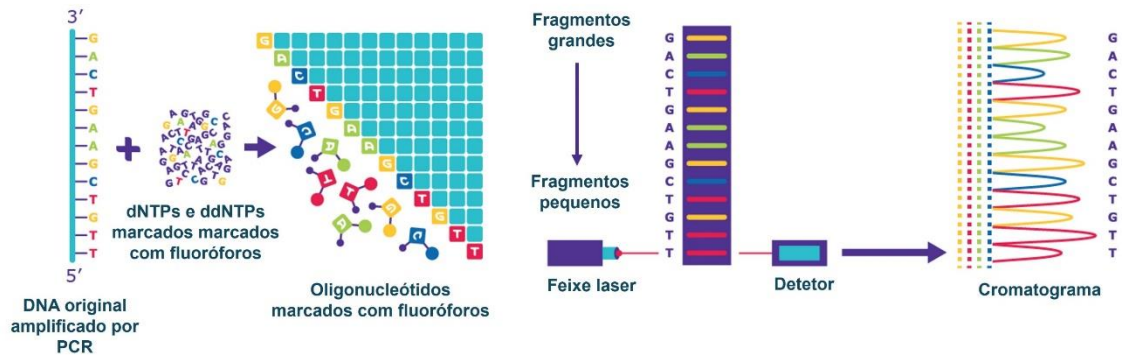


Figura 2.8: Esquema representativo da sequenciação de DNA pelo método de Sanger. A amostra de DNA é amplificada por PCR com dNTPs e ddNTPs, estes últimos marcados com fluoróforos. A incorporação aleatória dos ddNTPs gera fragmentos de diferente comprimento, cada um terminando com uma base marcada. Após separação por eletroforese capilar, os fragmentos passam por um feixe laser, são detectados com base na emissão fluorescente e convertidos num cromatograma, que representa a sequência do DNA. Adaptado de *Sigma-Aldrich* [93].

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

O objetivo geral da presente dissertação de mestrado prende-se com a caracterização molecular das variantes de Hemoglobina encontradas durante um Programa de Rastreamento Neonatal de Anemia das Células Falciformes (ACF) em Angola, contribuindo para a compreensão da diversidade genética das hemoglobinas nesse país.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Como objetivos específicos da presente dissertação, foram traçados os seguintes:

- Identificar as variantes de hemoglobina detetadas em amostras de recém-nascidos através de Focagem Isoelétrica (IEF), no âmbito do rastreio neonatal de ACF, e avaliar a sua prevalência.
- Caracterizar molecularmente as variantes de hemoglobina identificadas, recorrendo a técnicas moleculares, nomeadamente PCR-RFLP, Gap-PCR e sequenciação de Sanger.
- Avaliar o potencial impacto clínico das variantes detetadas, com base na literatura científica acerca das mutações detetadas.
- Contribuir com dados relevantes para a consolidação de programas de rastreio neonatal de hemoglobinopatias em Angola e noutros contextos idênticos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. TIPO DE ESTUDO E POPULAÇÃO

O presente estudo trata-se de um estudo prospetivo de coorte, com o intuito de identificar e caracterizar as hemoglobinopatias e variantes de hemoglobina encontradas durante um programa de rastreio neonatal de Anemia das Células Falciformes (ACF), intitulado “Rastreio Neonatal e desenvolvimento de coorte de crianças com Anemia das Células Falciformes, no Hospital Materno Infantil Dr. Manuel Pedro Azancot de Menezes, Angola”.

A população em estudo consiste na totalidade das crianças nascidas na maternidade do Hospital Materno Infantil Dr. Manuel Pedro Azancot de Menezes, em Angola, cujos responsáveis legais autorizaram a recolha de amostra de sangue do calcanhar para rastreio de ACF. A recolha de amostras decorreu durante 18 meses, entre junho de 2023 e dezembro de 2024.

4.2. ASPETOS ÉTICOS

O projeto na base da presente dissertação de mestrado foi aprovado pelo Comité Nacional de Ética de Angola (CE. Nº21/MINSA.INIS/2023) e pela Comissão de Ética da Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa (CE-ESTeSL-Nº. 28-2023) (Anexos I e II). Além disso, todos os representantes legais dos recém-nascidos incluídos no estudo assinaram um consentimento informado (Anexo III). As amostras foram devidamente codificadas, de forma a garantir que apenas os médicos responsáveis pelo eventual seguimento clínico dos recém-nascidos tenham acesso aos dados pessoais.

4.3. COLHEITA DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS

Previamente à recolha de amostras no Hospital Materno Infantil Dr. Manuel Pedro Azancot de Menezes, foi solicitada às grávidas a autorização para participação dos filhos no rastreio de ACF, bem como a assinatura do consentimento informado (Anexo III).

Foram colhidas amostras de sangue total, do calcanhar dos recém-nascidos, para papel de filtro, através de punção com lanceta estéril. Foram colhidos, para o papel, dois círculos de sangue de cada recém-nascido, tendo sido cada cartão identificado com o número da amostra correspondente. Os nomes e, sempre que possível, os contactos telefónicos e morada dos pais foram registados em formulário próprio, de forma a possibilitar futuros contactos em caso de diagnóstico de ACF ou outra hemoglobinopatia com significado clínico.

As amostras de sangue foram conservadas a uma temperatura de 4°C até serem transportadas para a Escola Superior de Tecnologias da Saúde de Lisboa, instituição na qual foram analisadas as amostras.

4.4. FOCAGEM ISOELÉTRICA

Foi realizada a eletroforese das hemoglobinas por Focagem Isoelétrica (IEF) de todas as amostras de sangue seco em papel de filtro. Para o efeito utilizou-se o equipamento Migele™ e o kit comercial RESOLVE™ *Hemoglobin kit Assay*.

A primeira etapa do procedimento consistiu em cortar, com o auxílio de um furador metálico, discos de papel (com sangue seco) de 6 mm de diâmetro. Posteriormente realizou-se a eluição das amostras a partir das manchas secas de sangue em papel de filtro, através da adição de solução de eluição fornecida no kit (*Hb elution solution*), e subsequente agitação. Após a preparação do gel e aplicação das amostras no mesmo, com recurso a um *template (sample application template)*, foram posicionadas tiras (*paper wicks*) embebidas em soluções catódicas e anódicas nas respetivas posições. O gel foi então transferido para o equipamento de eletroforese, Migele™. Logo após, programou-se a fonte de energia a 30 Watts, 1200 Volts, 100 miliamperes, durante 110 minutos, dando-se início à eletroforese. Concluída esta etapa, fixou-se o gel com Ácido Tricloroacético (TCA) a 10%. Por fim, procedeu-se à realização de lavagens e à coloração do gel com soluções fornecidas pelo kit. O protocolo detalhado encontra-se no Apêndice II.

4.5. EXTRAÇÃO DE DNA

A extração de DNA a partir das manchas de sangue seco em papel de filtro foi realizada com recurso ao kit comercial QIAamp DNA Mini Kit da QIAGEN.

Antes de iniciar o protocolo, a bancada foi desinfetada com lixívia a 10% e com a solução *Nucleases and Nucleic Acid Cleaner*, da NZYtech. A extração iniciou-se com a obtenção de três discos de amostra, com o auxílio do furador metálico. Esses foram colocados em *Eppendorfs* de 2 mL, seguindo-se a adição de 180 µl de *buffer* de lise de tecidos (*buffer* ATL) e incubação a 85°C durante 10 minutos. Após centrifugação, adicionou-se proteinase K e incubou-se a 56°C durante uma hora. De seguida adicionou-se *buffer* de lise (*buffer* AL), incubou-se a 70°C durante 10 minutos e, após nova centrifugação, adicionou-se etanol. A amostra foi depois transferida para uma coluna QIAamp, na qual ocorre a retenção do DNA após centrifugação. Seguiram-se ciclos de lavagens e centrifugação com os *buffers* AW1 e AW2. Por fim, realizou-se uma primeira eluição com 50 µl de *buffer* de eluição (*buffer* AE), seguida de incubação durante 40 minutos a 55°C e de uma nova eluição para melhorar a eficácia da extração. O protocolo completo e detalhado encontra-se no Apêndice III.

4.6. PCR-RFLP PARA DETEÇÃO DO SNP RS334 (HBS)

O PCR-RFLP foi realizado com o intuito de detetar o SNP rs334 (HBB: c.20A>T, p.Glu7Val), responsável pela HbS.

Para a reação de PCR utilizaram-se os primers *Forward* e *Reverse* apresentados no quadro 4.1, os quais permitem amplificar um fragmento de 390 pb (Apêndice IV). Preparou-se uma *Master Mix*, cuja composição para o processamento de uma amostra é a seguinte: 1µL de *primer Forward* (Quadro 4.1), 1µL de *primer Reverse* (Quadro 4.1), 2µL de água destilada e 10 µL de *Colourless master mix* da NZYtech. A esta mistura foram adicionados 6 µL de amostra, totalizando 20µL por reação (14µL de *Master Mix* + 6 µL de amostra). A amplificação foi realizada no termociclador *T100 Thermal Cycler* da *Bio-Rad*, utilizando as condições descritas no quadro 4.2.

Durante o tempo de amplificação, procedeu-se à preparação da mistura enzimática para a digestão dos produtos amplificados. A enzima de restrição utilizada foi a *Bsu36I* (*New England Biolabs*), que é produzida numa estirpe de *E. coli* geneticamente modificada para expressar o gene *Bsu36I* de *Bacillus subtilis* [70]. Esta enzima reconhece o local de restrição 5' CC↓TNAGG 3', hidrolisando entre a citosina (C) e a timina (T). No alelo

Wild type (ausência do SNP rs334), o fragmento amplificado apresenta dois locais de restrição para a *Bsu36I*, originando três fragmentos com 201, 176 e 13 pb (Apêndice V). Na presença da mutação (alelo mutado), a enzima reconhece apenas um local de restrição, resultando em dois fragmentos, com 377 e 13 pb (Apêndice V).

Para cada amostra, a enzima foi preparada através do seu descongelamento e posterior adição de 2 µL de tampão *rCutSmart* (*New England Biolabs*), 5 µL de água destilada e 1 µL de enzima.

Após o término da amplificação, os produtos amplificados foram então submetidos a digestão enzimática com a enzima de restrição *Bsu36I*. Foram incubados 12 µL de produto de PCR com 8 µL da mistura enzimática a 37°C durante 3 horas, para que se desse a digestão.

Por fim, os produtos resultantes da digestão foram separados por eletroforese em gel de agarose a 2% em tampão Tris-Borato-EDTA (TBE) e visualizados sob luz UV para análise do padrão de digestão. Para permitir a estimativa do tamanho dos fragmentos, utilizou-se o marcador molecular *ZR 50bp DNA Marker*, da Zymo Research.

Quadro 4.1: *Primers* utilizados no PCR RFLP para o SNP rs334

Primer	Sequência
Forward	5' ACCTCACCTGTGGAGCCAC 3'
Reverse	5' ACCAGCAGCCTAAGGGTGGGAAAATACACC 3'

Quadro 4.2: Condições da reação de PCR para detecção do rs334

Etapa	Temperatura	Duração	Ciclos
Desnaturação	95.0°C	5 minutos	1
	94.0°C	30 segundos	
Hibridação	57.0°C	30 segundos	35
Extensão	72.0°C	30 segundos	
Extensão final	72.0°C	10 minutos	1
Standby	4.0°C	∞ (indefinido)	1

4.7. PESQUISA DA DELEÇÃO - $\alpha^{3.7\text{kb}}$

Para a pesquisa da deleção - $\alpha^{3.7\text{kb}}$ recorreu-se à técnica de Gap-PCR, já abordada no capítulo 2. Embora o Gap-PCR clássico faça uso de apenas 3 *primers*, neste estudo utilizou-se um quarto *primer*, conforme previamente descrito na literatura, por *Dodé et. al* [94]. Em detrimento de uma única reação de amplificação, foram realizadas duas, uma para cada gene, HBA1 e HBA2, tal como descrito pelos mesmos autores.

No alelo normal, os *primers* A e B (Quadro 4.3) amplificam um fragmento de 999 pb (Apêndice VI), correspondente ao gene HBA2, enquanto os *primers* A' e C (Quadro 4.3) amplificam um fragmento de 2182 pb (Apêndice VII), correspondente ao gene HBA1. O *primer* A' desempenha um papel crucial na detecção da deleção em estudo, tendo sido desenhado para se ligar às regiões homólogas Y, que se encontram presentes tanto no gene HBA1 como no HBA2, tal como descrito no capítulo 2.2.2.2. Deste modo, o *primer* A' pode emparelhar-se com a região Y de ambos os genes, permitindo a amplificação de fragmentos com tamanhos distintos, dependendo da presença ou ausência da deleção. A Figura 4.1 representa esquematicamente os locais de ligação dos *primers* referidos, de forma a clarificar o descrito neste excerto.

A deleção - $\alpha^{3.7\text{kb}}$ conduz à remoção parcial de ambos os genes, incluindo a região Y do gene HBA1. Com a remoção dessa região, o local de ligação do *primer* A' no HBA1 deixa de existir, impedindo a amplificação do fragmento de 2182 pb. Por outro lado, a região Y do gene HBA2, que permanece intacta e onde o *primer* A' consegue ligar-se, passa a estar mais próxima da região de emparelhamento do *primer* C. Esta nova proximidade permite que os *primers* A' e C amplifiquem um fragmento de aproximadamente 1900 pb (Apêndice VIII), que é específico da presença da deleção - $\alpha^{3.7}$. Já na ausência da deleção, a distância entre os *primers* A' (região Y do gene HBA1) e C (jusante do gene HBA1) é demasiado grande para permitir a amplificação do fragmento. Assim, a presença de um único fragmento de 1900 pb indica a existência do alelo deletado em homozigotia, enquanto a presença exclusiva dos fragmentos de 999 pb (A/B) e 2182 pb (A'/C) indica um genótipo normal, ou seja, sem deleção. Por fim, nos indivíduos heterozigóticos observa-se a presença simultânea dos três fragmentos.

Quadro 4.3: *Primers* utilizados no Gap-PCR para identificação da deleção $-\alpha^{3.7}$

Primer	Sequência
A	5' GGACTCCCCTGCGGTCCAGG 3'
B	5' CTCCATTGTTGGCACATTCCGGG 3'
A'	5' GGGATGCACCCACTGGCACT 3'
C	5' CTGCTGTCCACGCCCATGCC 3'

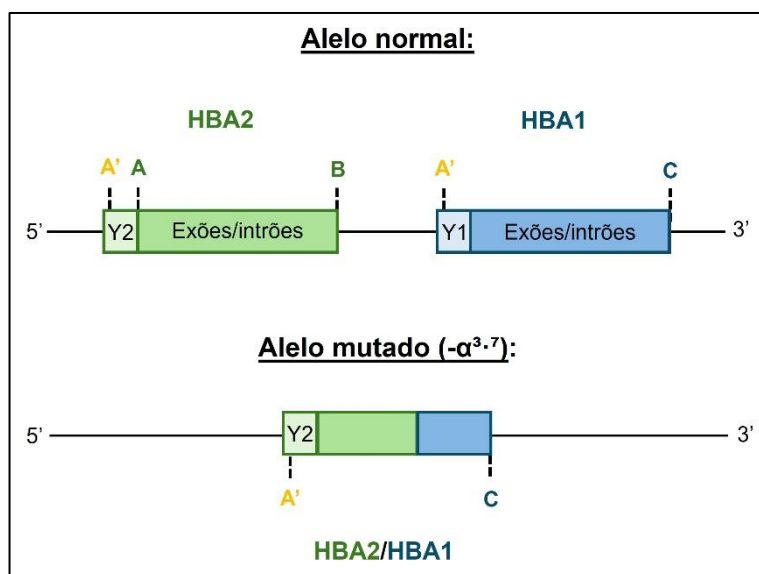


Figura 4.1: Representação esquemática dos locais de ligação dos *primers* A, B, C e A', usados no Gap-PCR para a pesquisa da deleção $-\alpha^{3.7}$.

Para a pesquisa da deleção foram então realizadas duas reações de PCR distintas, cada uma com um par de *primers* distinto, como discutido.

Na reação destinada à amplificação do gene HBA1 foram utilizados, por cada amostra a processar, 10 μL de enzima *Platinum Hot-Start* (Thermo Fisher), 4 μL de *GC Enhancer*, 1 μL do *primer* A' (Quadro 5), 1 μL do *primer* C (Quadro 5), 2 μL de água destilada e 2 μL de amostra, perfazendo um volume total de 20 μL . Para a amplificação do gene HBA2, a mistura reacional continha 10 μL da mesma enzima, 4 μL de *GC Enhancer*, 1 μL de *primer* A (Quadro 5), 1 μL de *primer* B (Quadro 5), 2 μL de Cloreto de Magnésio e 2 μL de amostra, num volume total de 20 μL . A amplificação foi posteriormente realizada no Termociclador *T100 Thermal Cycler* da BioRad, utilizando as condições de amplificação descritas no quadro 4.4.

Para permitir a observação e interpretação dos resultados, procedeu-se à análise dos produtos amplificados por eletroforese em gel de agarose a 2% e posterior visualização sob luz UV. Foi utilizado um marcador molecular de 1000pb (*GeneRuler 1kb DNA Ladder*, Thermo Fisher) para permitir a estimativa do tamanho dos fragmentos amplificados.

Quadro 4.4: Condições da reação de PCR para a amplificação dos genes HBA1 e HBA2 para a pesquisa de deleção - $\alpha^{3.7kb}$

Etapa	Temperatura	Duração	Ciclos
Desnaturação inicial	94.0°C	5 minutos	1
Desnaturação	94.0°C	1 minuto	40
Hibridação	64.0°C	1 minuto	
Extensão	68.0°C	1 minuto	
Extensão final	68.0°C	10 minutos	1
Standby	4.0°C	∞ (indefinido)	

4.8. AMPLIFICAÇÃO DO GENE HBB

Para que posteriormente pudesse ser realizada a sequenciação de Sanger dos exões 1 e 2 do gene HBB, foi realizada a sua amplificação por PCR.

Para o efeito, foram utilizados os *primers* exibidos no quadro 4.5, conforme descrito por Borges *et al.* [33], que amplificam um fragmento com cerca de 627 pb (Apêndice IX).

Para a reação de PCR preparou-se uma *Master Mix*, cuja composição para o processamento de uma amostra é a seguinte: 0.5 μ L de *primer Forward* (Quadro 4.5), 0.5 μ L de *primer Reverse* (Quadro 4.5), 6.5 μ L de água destilada e 12.5 μ L de enzima Taq *Platinum* (Thermo Fisher). Para cada reação foram adicionados 5 μ L de amostra, totalizando 25 μ L (20 μ L de *Master Mix*. + 5 μ L de amostra). A amplificação foi posteriormente realizada no Termociclador *T100 Thermal Cycler* da BioRad, utilizando as condições de amplificação descritas no quadro 4.6.

Para verificar a correta amplificação dos exões 1 e 2 do gene HBB, os produtos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 2% em tampão TBE e visualizados sob luz UV.

Quadro 4.5: *Primers* utilizados para a amplificação do 1º e 2º exão do gene HBB

<i>Primer</i>	Sequência
<i>Forward</i>	5' AGCAGGGAGGGCAGGAGCCAG 3'
<i>Reverse</i>	5' CCCCTTCCTATGACATGAACTTAACC 3'

Quadro 4.6: Condições da reação de PCR para a amplificação do 1º e 2º exão do gene HBB

Etapa	Temperatura	Duração	Ciclos
Desnaturação inicial	95.0°C	5 minutos	1
1º ciclo			
Desnaturação	94.0°C	15 segundos	10
Hibridação	65.0°C	15 segundos	
Extensão	68.0°C	30 segundos	
2º ciclo			
Desnaturação	94.0°C	15 segundos	30
Hibridação	62.0°C	15 segundos	
Extensão	68.0°C	30 segundos	
Extensão final	68.0°C	5 minutos	1
<i>Standby</i>	4.0°C	∞ (indefinido)	1

Após a análise dos resultados da sequenciação, optou-se por realizar, adicionalmente para algumas amostras, a sequenciação do 3º exão do gene HBB, pelo que foi necessário proceder à sua amplificação por PCR. Para o efeito, foram utilizados os *primers* exibidos no quadro 4.7, conforme descrito por Cao *et al.* [71], que amplificam um fragmento com cerca de 668 pb (Apêndice X).

Para a reação de PCR preparou-se uma *Master Mix*, cuja composição para o processamento de uma amostra consistiu na seguinte: 2 µL de *primer Forward* (Quadro 4.7), 2 µL de *primer Reverse* (Quadro 4.7), 3.5 µL de água destilada e 12.5 µL de enzima Taq *Platinum* (Thermo Fisher). Para cada reação foram adicionados 5 µL de amostra, totalizando 25 µL (20 µL de *Master Mix*. + 5 µL de amostra). A amplificação foi posteriormente realizada no Termociclador *T100 Thermal Cycler* da BioRad, utilizando as condições de amplificação descritas no quadro 4.8.

De forma a confirmar a correta amplificação do 3º exão do gene HBB, os produtos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 2% em tampão TBE e visualizados sob luz UV.

Quadro 4.7: *Primers* utilizados para a amplificação do 3º exão do gene HBB

Primer	Sequência
<i>Forward</i>	5' CATGCCTCTTTGCACCATTTC 3'
<i>Reverse</i>	5' TTAGCTGTTTGCAGCCTCAC 3'

Quadro 4.8: Condições da reação de PCR para a amplificação do 3º exão do gene HBB

Etapa	Temperatura	Duração	Ciclos
Desnaturação inicial	95.0°C	5 minutos	1
1º ciclo			
Desnaturação	94.0°C	15 segundos	40
Hibridação	55.0°C	15 segundos	
Extensão	68.0°C	15 segundos	
Extensão final	68.0°C	5 minutos	
<i>Standby</i>	4.0°C	∞ (indefinido)	1

4.9. AMPLIFICAÇÃO DOS GENES HBA1 E HBA2

Para a amplificação por PCR dos 3 exões dos genes HBA1 e HBA2 foram utilizados os *primers* exibidos no quadro 4.9, conforme descrito por Lopes A.[95]. Estes *primers* amplificam um fragmento de aproximadamente 1314 pb para o gene HBA1 e de 1338 pb para o gene HBA2 (Apêndice XI).

Para a reação de PCR foi usada uma Master Mix cuja composição para o processamento de uma amostra é a seguinte: 1 µL de *primer Forward* (Quadro 4.9), 1 µL de *primer Reverse* (Quadro 4.9), 2.5 µL de enzima Taq *Platinum* (Thermo Fisher), 5 µL de GC Enhancer e 0,5 µL de Cloreto de Magnésio (MgCl₂). Para cada reação foram adicionados 5 µL de amostra, totalizando 28 µL (23 µL de *Master Mix*. + 5 µL de amostra). A amplificação foi posteriormente realizada no Termociclador *T100 Thermal Cycler* da BioRad, utilizando as condições de amplificação descritas no quadro 4.10.

De forma a confirmar a correta amplificação, os produtos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 2% em tampão TBE e visualizados sob luz UV.

Quadro 4.9: *Primers* utilizados para a amplificação dos 3 exões dos genes HBA1 e HBA2

Primer	Sequência
<i>Forward</i> (HBA1 e HBA2)	5' GGTGCACGAGCCGACAGCGC 3'
<i>Reverse</i> (HBA1)	5' CTGGACTTCGCGGTGGCT 3'
<i>Reverse</i> (HBA2)	5' GCAGGCCTGGCACCTCTCAG 3'

Quadro 4.10: Condições da reação de PCR para a amplificação dos 3 exões dos genes HBA1 e HBA2

Etapa	Temperatura	Duração	Ciclos
Desnaturação inicial	95.0°C	5 minutos	1
1º ciclo			
Desnaturação	94.0°C	15 segundos	40
Hibridação	55.0°C	15 segundos	
Extensão	68.0°C	15 segundos	
Extensão final	68.0°C	5 minutos	
<i>Standby</i>	4.0°C	∞ (indefinido)	1

4.10. SEQUENCIAÇÃO DE SANGER DOS GENES ALFA E BETA

A sequenciação de Sanger dos genes HBB e HBA, foi realizada pela empresa StabVida, que se encarregou também pela purificação prévia das amostras enviadas para análise. Para além das amostras a analisar, foram igualmente enviados os *primers* específicos utilizados nas reações de amplificação (descritos nos capítulos 4.8 e 4.9), que serviram de base para a sequenciação. Primeiramente, as amostras foram sequenciadas usando os *primers forward*, tendo-se recorrido aos *primers reverse* apenas quando se mostrou necessário.

Importa referir que se verificaram dificuldades técnicas na amplificação dos genes HBA1 e HBA2, tendo inviabilizado a sua sequenciação na maioria das amostras previstas. No caso do HBA2 foi possível obter resultados em parte das amostras planeadas, já relativamente ao HBA1, não foi possível proceder à sequenciação de nenhuma das amostras, como será discutido mais à frente.

Os resultados da sequenciação foram fornecidos sob a forma de cromatogramas em ficheiros *.ab1*, que foram analisados manualmente com o auxílio do software de visualização de sequências *Chromas* (versão 2.6.6). No mesmo software, procedeu-se à correção manual das sequências nucleotídicas. A interpretação das sequências teve

em conta a definição clara dos picos, bem como a ausência de ruído de fundo. Nesse sentido, sempre que se verificou a presença de ruído considerado impeditivo de uma correta e confiável análise procedeu-se à repetição da sequenciação utilizando os *primers* reverse. Nos casos em que a qualidade continuava inferior ao desejado, procedeu-se à repetição da amplificação e sequenciação das amostras.

Recorrendo à ferramenta *Nucleotide Basic Local Alignment and Search Tool* (BLAST) integrada no *Chromas*, as sequências foram sujeitas a uma pesquisa de homologia com sequências presentes na base de dados no *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), permitindo validar se as regiões sequenciadas correspondiam efetivamente aos genes alvo.

Como parte da análise bioinformática, foi realizado o alinhamento das sequências obtidas por sequenciação com as sequências de referência (cDNA), de forma a confirmar a integridade das regiões amplificadas. Para este fim, de forma a colmatar a problemática dos softwares pagos, recorreu-se à programação em *Python*, no ambiente *Google colab*, com recurso à biblioteca *Biopython* [96], comumente utilizada no ramo da bioinformática. O alinhamento foi efetuado utilizando a função *pairwise2.align.localms* do módulo *Bio.pairwise2*, que permite realizar alinhamentos locais entre sequências, com base no algoritmo de *Smith-Waterman*. Este é um algoritmo que permite determinar com precisão a melhor correspondência entre segmentos de duas sequências, maximizando um score baseado em pares de nucleótidos coincidentes e penalizações por lacunas [97], [98]. A Figura 4.2 representa o Diagrama de Atividades UML (*Unified Modeling Language*) correspondente à implementação do código descrito, ilustrando de forma sequencial as etapas envolvidas no processo de alinhamento local das sequências.

As variantes identificadas foram registadas e posteriormente identificadas com auxílio da base de dados genómica *Ensembl*, tendo-se utilizado como referência os transcritos ENST00000335295.4 (HBB-201) e ENST00000251595.11 (HBA2-201) dos genes HBB e HBA2, alinhados ao genoma de referência GRCh38. A classificação e identificação das variantes foram complementadas por consulta às bases de dados ClinVar e dbSNP, com o objetivo de verificar a sua descrição prévia, frequência populacional e possível associação a fenótipos clínicos.

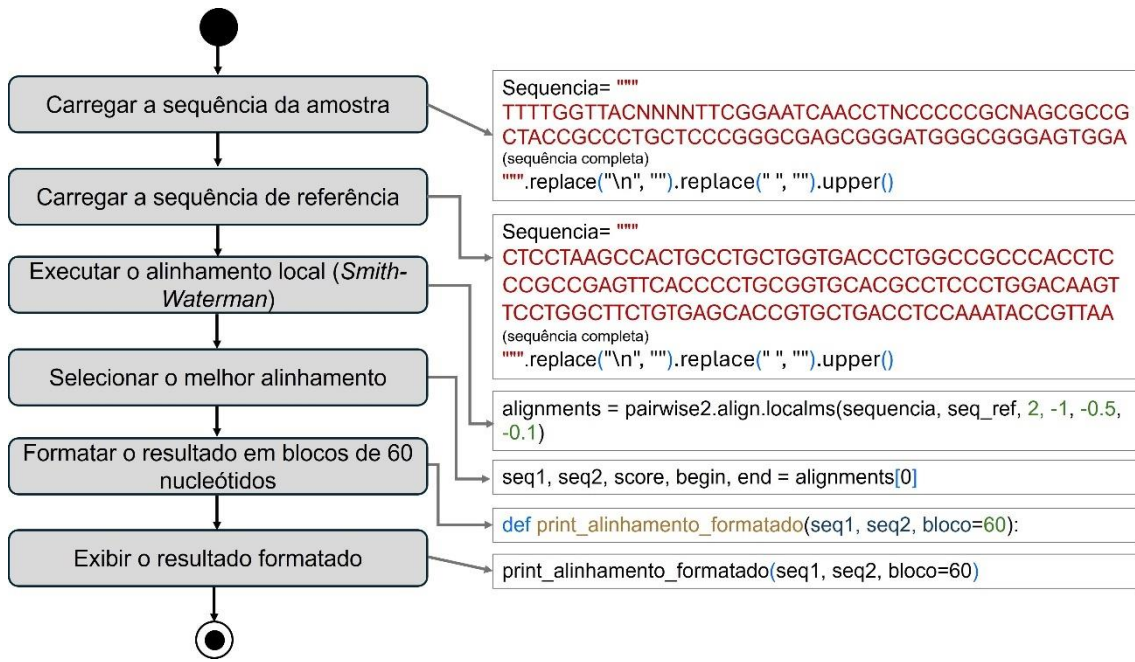


Figura 4.2: Diagrama de Atividades UML correspondente à implementação do código para o alinhamento local das sequências das amostras com a sequência de referência, utilizando o algoritmo de *Smith-Waterman*.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. FOCAGEM ISOELÉTRICA E PCR-RFLP

A análise por Focagem Isoelétrica (IEF) foi realizada com o objetivo de caracterizar os perfis de hemoglobina presentes nas amostras em estudo, permitindo desde logo identificar os recém-nascidos com fenótipos AA, AS, SS e outros desconhecidos. Assim, esta técnica permitiu identificar padrões sugestivos de hemoglobinas anormais, bem como distinguir possíveis casos de talassemia através da presença de frações minoritárias ou alterações no perfil normal de hemoglobinas.

Os perfis obtidos foram visualmente comparados com o perfil do controlo, cujo padrão de migração é conhecido (Figura 5.1).

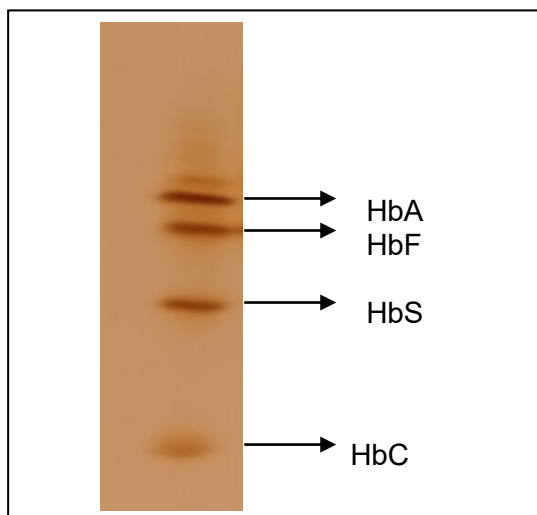


Figura 5.1: Perfil de migração do controlo. Adaptado de: Sebia [99].

Foram analisadas, por IEF, 13 256 amostras, sendo que em todas elas se verificou uma forte banda correspondente à Hemoglobina Fetal (HbF), tal como esperado em recém-nascidos. Das amostras analisadas, 10 347 apresentaram um perfil compatível com o fenótipo AA (78.06%), correspondente a recém-nascidos saudáveis, sem alterações detetáveis. Em 2681 amostras (20.22%) observou-se a presença de uma banda adicional na posição correspondente à Hemoglobina S (HbS), sugerindo traço falciforme (genótipo AS). Outras 183 amostras (1.38%) revelaram a ausência de banda na zona da Hemoglobina A (HbA), mas a presença na região da HbS, conduzindo ao diagnóstico de Anemia das Células Falciformes (genótipo SS). Por outro lado, 45 amostras (0.34%) demonstraram padrões atípicos, dúbios, ou com bandas inequivocamente não correspondentes à HbA ou HbS, constituindo estas 45 amostras o objeto de estudo da presente dissertação. A Figura 5.2 descreve graficamente esta distribuição.

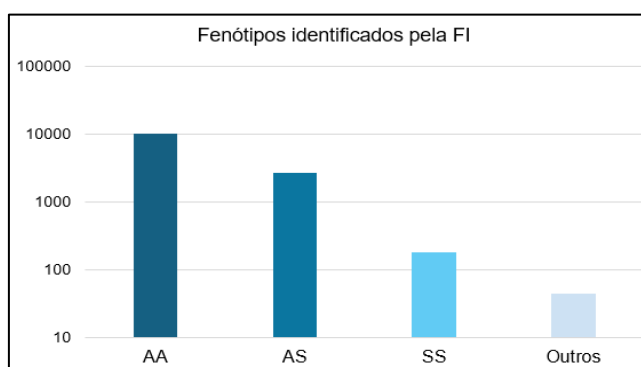


Figura 5.2: Fenótipos identificados pela IEF

Com base nos perfis obtidos na IEF definiu-se uma estratégia de investigação molecular complementar para cada amostra, podendo esta incluir a realização das técnicas de PCR-RFLP, Gap-PCR e sequenciação dos genes HBA ou HBB. Métodos eletroforéticos, como a IEF, permitem identificar as variantes de hemoglobina mais comuns e clinicamente relevantes, contudo, a identificação precisa de variantes menos comuns torna-se por vezes complexa devido à semelhança na mobilidade eletroforética, o que reforça a necessidade de investigação molecular adicional [100].

Sempre que o perfil eletroforético sugeriu a presença de HbS, ou quando deixava dúvidas quanto à sua presença, procedeu-se à confirmação molecular através de PCR-RFLP de forma a confirmar a presença do SNP rs334 (HbS).

Relativamente à interpretação dos resultados do PCR-RFLP é importante referir que, embora teoricamente sejam gerados três fragmentos no alelo *wild-type* (201 pb, 176 pb e 13 pb), apenas são visualizadas duas bandas no gel, dado que o fragmento de 13 pb é demasiado pequeno para ser observado. Além disso, os fragmentos de 201 e 176 pb

apresentam tamanhos muito próximos, o que leva a que estas duas bandas surjam sobrepostas ou muito próximas, parecendo uma só, não sendo possível observá-las como distintas. Já no caso do alelo mutado, a digestão enzimática origina dois fragmentos de 377 e 13 pb, não sendo este último fragmento visível no gel. Assim, a presença de uma única banda de 377 pb no gel corresponde ao genótipo SS (Figura 5.3), já a presença de duas bandas sobrepostas ou muito próximas dizem respeito ao genótipo AA (Figura 5.3) e, por fim, a presença de uma banda de 377 pb e de duas bandas sobrepostas ou muito próximas corresponde ao genótipo AS (Figura 5.3).

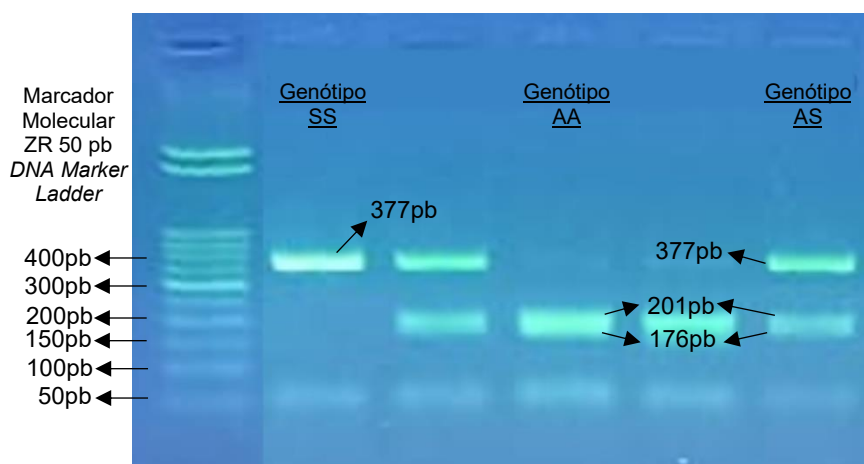


Figura 5.3: Exemplo dos padrões dos genótipos SS, AA e AS no gel de eletroforese. Genótipo SS: uma banda de 377pb. Genótipo AA: uma banda de 201pb e uma de 176pb. Genótipo AS: uma banda de 377pb, uma banda de 201pb e uma banda de 176pb. Note-se que as bandas de 201 e 176pb aparentam ser uma só devido à proximidade dos seus tamanhos.

Nas amostras R1, R2, R4 e R22 (Figura 5.4) foi observada, na IEF, uma banda ténue na zona correspondente à HbS. Contudo, a análise molecular por PCR-RFLP revelou um perfil compatível com o genótipo AA (Figura 5.5), ou seja, a ausência da mutação responsável pela HbS. Assim, as bandas observadas na zona da HbS podem corresponder a artefactos da técnica ou, eventualmente, a outras variantes raras de hemoglobina que migram numa posição semelhante à HbS. Este tipo de discrepância entre os resultados da IEF e do teste molecular tem sido descrito na literatura [1], [101], que destaca que algumas variantes podem apresentar padrões de migração semelhantes à HbS, levando a potenciais falsos positivos. Tais resultados reforçam a necessidade de utilização de metodologias complementares, nomeadamente a sequenciação. Nesse sentido, nas amostras em causa procedeu-se à sequenciação do gene HBB, de forma a confirmar a presença ou ausência da HbS ou de outras mutações na cadeia da beta globina.

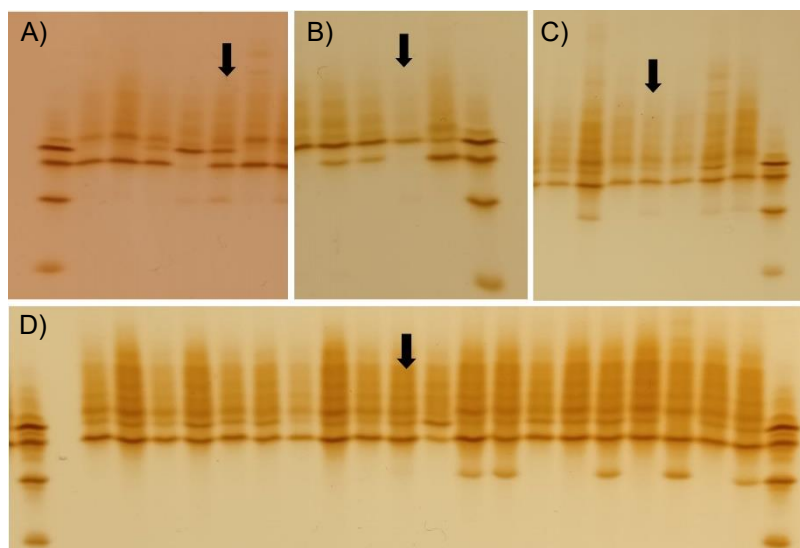


Figura 5.4: Focagens isoeletricas das amostras R1 (A), R2 (B), R4 (C) e R22 (D), que se encontram identificadas pelas setas pretas. Presença de bandas ténues na zona de migração da HbS.

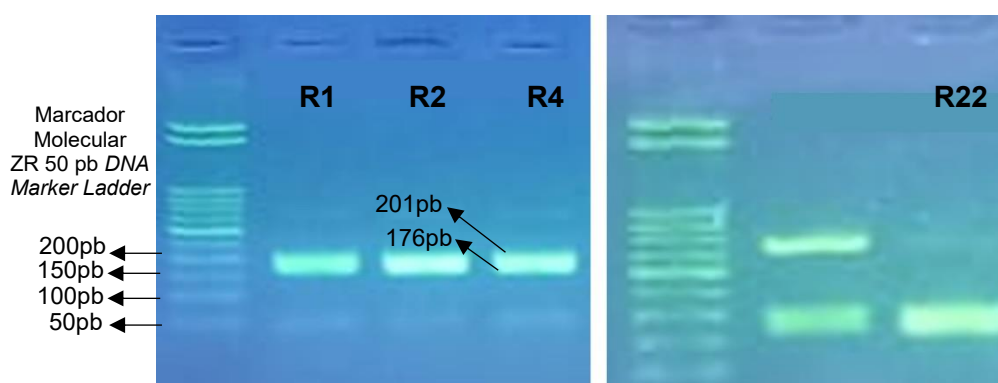


Figura 5.5: PCR-RFLP para pesquisa do SNP rs334 (HbS) nas amostras R1, R2, R4 e R22. Em todas as amostras são observadas duas bandas muito próximas (de 176 e 201 pb), o que corresponde ao genótipo AA.

Por outro lado, nas amostras R9, R13, R19 e R20 (Figura 5.6), a IEF revelou a presença de uma banda correspondente à HbS mais forte do que a banda da HbA. Em ambos os casos, o PCR-RFLP confirmou o genótipo AS (Figura 5.7). Este perfil caracterizado pela redução de HbA em relação à HbS é sugestivo da presença simultânea de HbS e de uma variação quantitativa na produção das cadeias de beta globina, dado que a redução da HbA é um achado típico das β -talassemias [31], [72]. De forma a confirmar a presença de mutações responsáveis por β -talassemia procedeu-se à sequenciação do gene HBB.

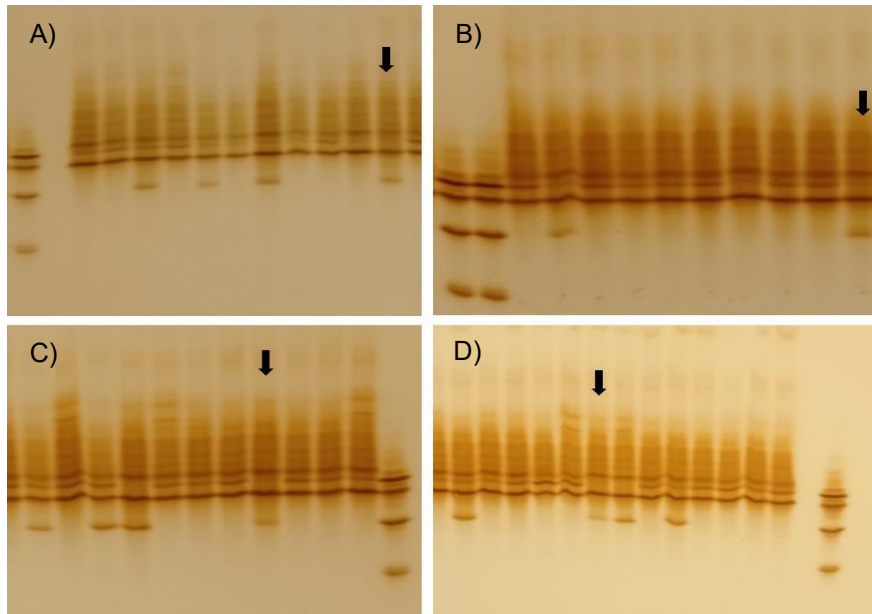


Figura 5.6: Focagens isoelétricas das amostras R9 (A), R13 (B), R19 (C) e R20 (D), identificadas pelas setas pretas. Presença de bandas na zona de migração da HbS mais fortes que as bandas da HbA.

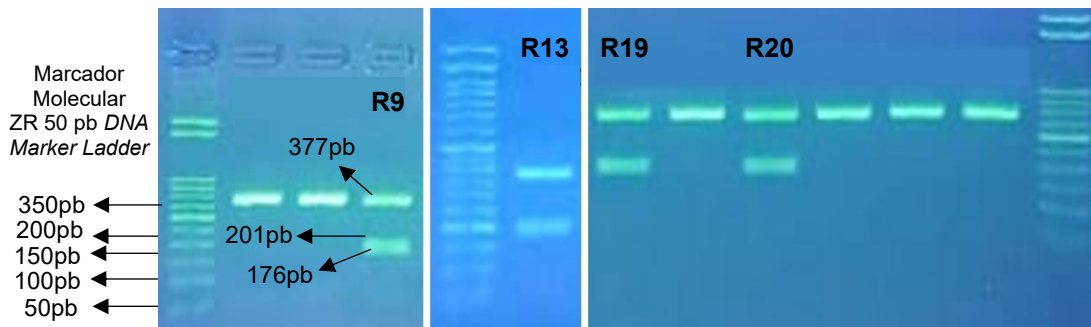


Figura 5.7: PCR-RFLP para pesquisa do SNP rs334 (HbS) nas amostras R9, R13, R19 e R20. Em todas as amostras são observadas duas bandas muito próximas (de 176 e 201 pb), e outra maior (377 pb) o que corresponde ao genótipo AS.

Em onze amostras (R3, R6, R7, R8, R18, R10, R11, R14, R21, R23 e R24) foi observada na IEF, a presença de uma banda compatível com a hemoglobina C (HbC). Em todas as amostras referidas, embora com intensidades diferentes, foi possível distinguir a banda adicional, na zona típica da HbC, em associação com a banda correspondente à HbA, o que sugere heterozigotia para HbC (Figura 5.8). Em nenhuma das amostras foi observada migração compatível com HbS ou outras variantes anormais.

A elevada frequência de HbC observada neste grupo de amostras é coerente com o contexto epidemiológico descrito na literatura, dado que a HbC é uma das variantes estruturais de hemoglobina mais comuns a nível mundial e, particularmente na África Ocidental. Ainda que seja esta a região africana que regista mais casos, esta variante é comumente encontrada ao longo de todo o continente [57], [102].

Ainda que nas amostras estudadas não se tenha verificado a presença simultânea de HbS, é importante referir que a heterozigotia composta HbSC é comum no continente africano. Vários estudos indicam que cerca de 40 a 50% dos indivíduos com Anemia das Células Falciformes em países como Gana possuem HbC concomitantemente com a HbS [103], [104]. A sua ausência no presente conjunto de amostras pode dever-se à variabilidade populacional ou a limitações da escala regional do estudo, que estudou crianças de um único hospital do continente africano.

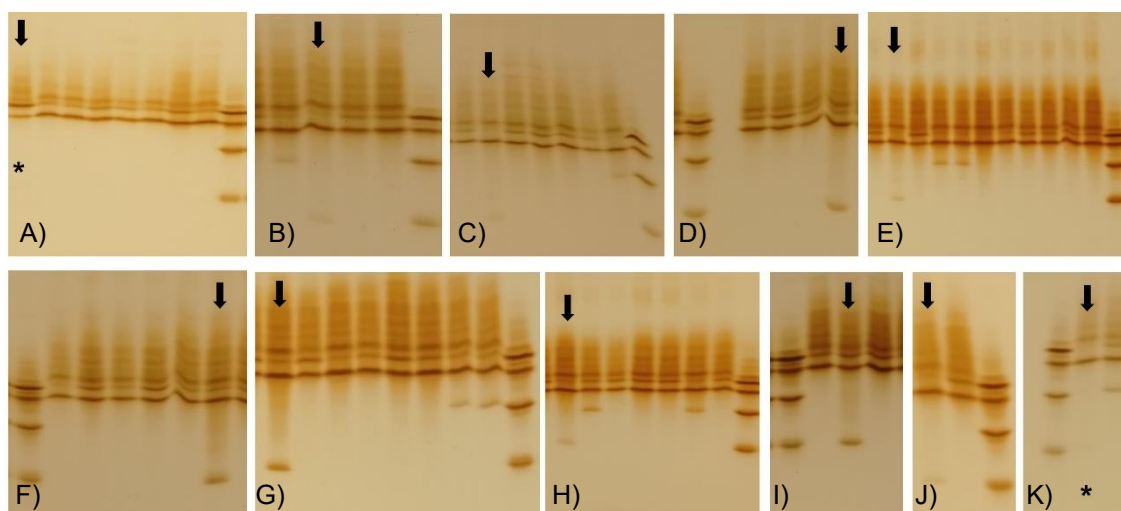


Figura 5.8: Focagens isoelétricas das amostras R3 (A), R6 (B), R7 (C), R8 (D), R18 (E), R10 (F), R11 (G), R14 (H), R21 (I) e R23 (J) e R24 (K), identificadas pelas setas pretas. Presença de bandas na zona de migração da HbC. * Estas amostras apresentaram uma banda extremamente tênue na zona da HbC, apesar de não ser possível visualizar nas fotografias captadas das mesmas.

Duas amostras (R5 e R16) apresentaram, na IEF, uma banda adicional com migração logo abaixo da zona da HbS (Figura 5.9), o que indica a presença de uma hemoglobina com um ponto isoelétrico superior ao da HbS. A presença desta banda sugere a presença de uma variante estrutural, provavelmente da cadeia beta da globina. Este raciocínio surge do facto de, no caso de uma variante da cadeia alfa, ser geralmente esperado o surgimento de várias bandas adicionais, uma vez que a cadeia alfa participa na composição de todas as hemoglobinas principais presentes nos recém-nascidos (HbF, HbA) [3], [15], [16]. Assim, uma mutação na cadeia alfa daria origem a múltiplas

hemoglobinas variantes, com diferentes combinações de cadeias, resultando em várias bandas distintas na IEF. Por outro lado, uma variante da cadeia beta afeta exclusivamente a HbA ($\alpha_2\beta_2$), sendo, por isso, comum a observação de apenas uma banda adicional quando essa mutação se encontra em heterozigotia, como parece ser o caso nas amostras em questão.

Por se tratar de uma banda muito próxima da zona da HbS, e para confirmar que não se tratava efetivamente dessa variante, procedeu-se à realização do PCR-RFLP para detecção do SNP rs334, o qual resultou no genótipo AA para ambas as amostras (Figura 5.10).

Para confirmação, foi realizada a sequenciação do gene HBB, com o objetivo de identificar a mutação responsável por este padrão eletroforético.

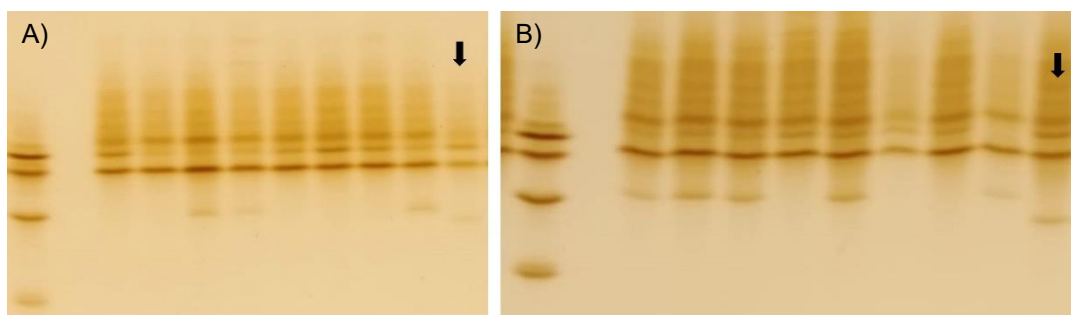


Figura 5.9: Focagens isoeletricas das amostras R5 (A) e R16 (B), identificadas pelas setas pretas. Presença de uma banda extra abaixo da zona de migração da HbS.

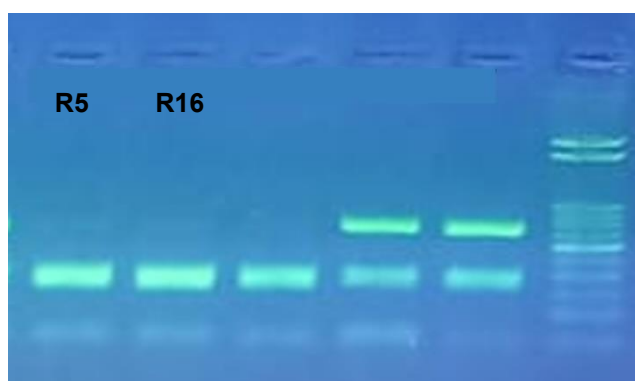


Figura 5.10: PCR-RFLP para pesquisa do SNP rs334 (HbS) nas amostras 1777 e 9320. Em todas as amostras são observadas duas bandas muito próximas (de 176 e 201 pb), o que corresponde ao genótipo AA.

Um dos padrões mais frequentemente encontrado nesta investigação corresponde à presença das bandas habituais de HbF e HbA acompanhadas por duas bandas adicionais, o que se verificou em doze amostras (R28, R27, R33, R34, R35, R36, R37, R31 e R38, R39, R40 e R41). Este padrão com múltiplas bandas extra (Figura 5.11), como visto, é altamente sugestivo da presença de uma variante estrutural da cadeia alfa, dado que esta faz parte da estrutura de todas as hemoglobinas normalmente presentes nos recém-nascidos.

A migração observada é compatível com Hb G-Philadelphia (HbG_{Ph}), uma variante da cadeia alfa comum na população africana, que surge por uma substituição no gene HBA2 ou no gene híbrido $\alpha_2\alpha_1$, resultante da deleção 3.7kb [38], [40], [73]. O padrão observado revela, do ânodo para o cátodo, a presença de uma banda correspondente à HbA, seguida por uma banda da HbF, abaixo da qual se identifica uma banda compatível com a HbG_{Ph}, ligeiramente acima da zona de migração da HbS. Abaixo da zona da HbS, observa-se ainda uma banda compatível com a HbF anormal, resultante da combinação da cadeia mutada alfa com a cadeia gama ($\alpha_2^{\text{Gph}}\gamma_2$) [73].

Embora se hipotetize que a banda na zona de migração da HbS diga respeito à referida HbF mutada, optou-se por realizar na mesma o PCR-RFLP para confirmar (Figura 5.12). Esta técnica revelou o genótipo AA para todas as amostras à exceção das amostras R37 e R39, que revelaram ser AS. Apesar de o padrão de migração das amostras R37 e R39 ser semelhante ao das restantes supracitadas, o PCR-RFLP indicou a presença do alelo S, o que levanta a hipótese de que a banda detetada na zona de migração da HbS deverá corresponder de facto a essa, sem excluir a possível coexistência de outras variantes, nomeadamente da cadeia alfa. De facto, tem sido descrito na literatura que indivíduos heterozigóticos para variantes de ambas as cadeias apresentam quatro componentes de hemoglobina, que são formadas pelas várias combinações. Os quatro tipos de hemoglobina são, então: HbA ($\alpha_2\beta_2$), hemoglobina com cadeia alfa mutada ($\alpha^x_2\beta_2$), hemoglobina com cadeia beta mutada ($\alpha_2\beta^y_2$) e a molécula híbrida ($\alpha^x_2\beta^y_2$) [105]. Assim, a banda extra (não correspondente à HbS) nestas amostras, poderá ser, de facto, uma hemoglobina híbrida HbS/Hb α^x . Importa salientar que a formação desta forma híbrida pressupõe também a presença da hemoglobina com apenas a cadeia alfa mutada ($\alpha^x_2\beta_2$), ainda que esta possa não se distinguir visualmente na IEF devido a sobreposição de migração ou menor expressão, o que poderá ser o caso nestas amostras.

Já nas restantes amostras, nas quais se confirmou, pelo PCR-RFLP, a ausência da HbS, a banda na zona de migração dessa variante poderá corresponder, como já

discutido, à HbF com uma cadeia mutada para a HbG_{Ph}. Porém, apesar de já ter sido excluída a presença de HbS, não se pode rejeitar a hipótese de que a banda observada seja resultante de uma hemoglobina híbrida composta por uma variante da cadeia α e da cadeia β .

Estes dados realçam assim a importância da confirmação molecular para clarificar padrões migratórios dúbios e complexos. Além disso, depreende-se que variantes com mobilidade semelhante podem conduzir a interpretações ambíguas e incorretas com base apenas na eletroforese.

Como investigação adicional destas amostras, considerou-se adequada a realização da técnica de Gap-PCR para pesquisar a deleção de 3.7kb, que é comumente encontrada simultaneamente com a HbG_{Ph}, bem como a sequenciação dos genes HBA.

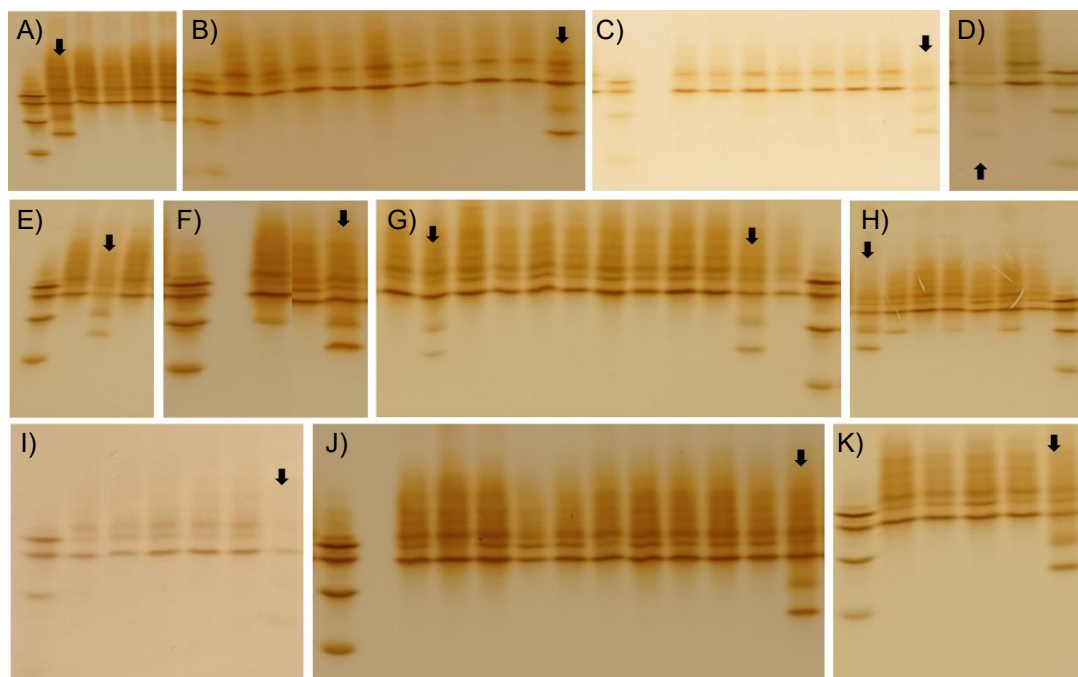


Figura 5.11: Focagens isoeletricas das amostras R28 (A), R27 (B), R33 (C), R34 (D), R35 (E), R36 (F), R37 (G esquerda), R31 (G direita) e R38 (H), R39 (I), R40 (J) e R41 (K), identificadas pelas setas pretas. Observam-se duas bandas extra em todas as amostras, presumivelmente correspondentes à HbG_{Ph} e à HbF com a cadeia alfa mutada.

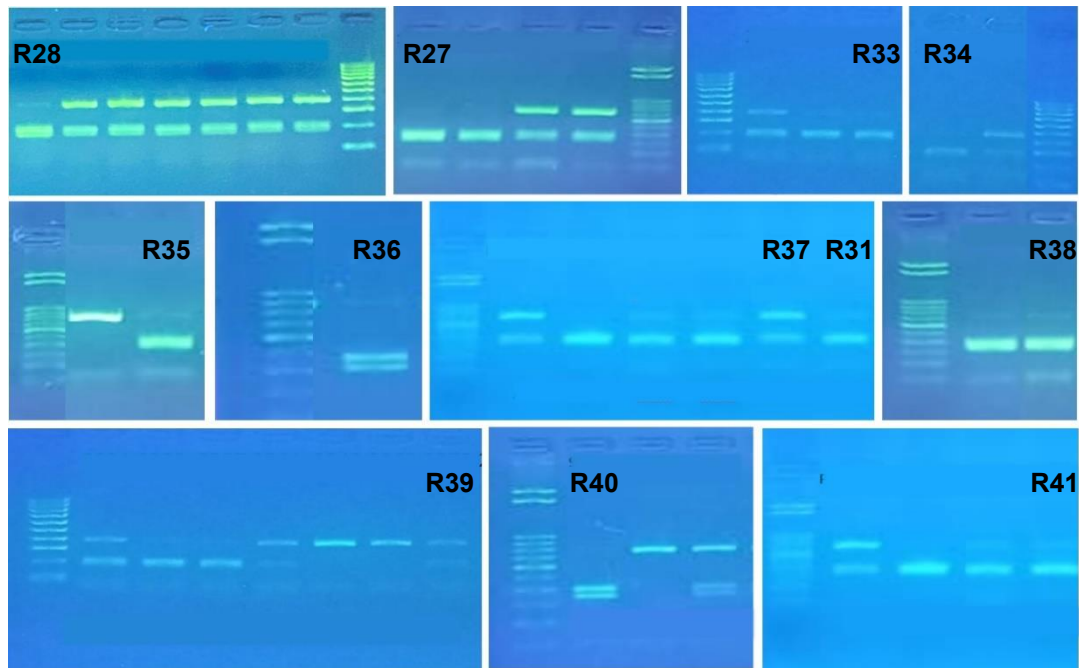


Figura 5.12: PCR-RFLP para pesquisa do SNP rs334 (HbS) nas amostras R28, R27, R33, R34, R35, R36, R37, R31, R38, R39, R40 E R41. Nas amostras R37 e R39 são observadas duas bandas muito próximas (de 176 e 201 pb) uma terceira (377 pb), o que corresponde ao genótipo AS. Nas restantes amostras verificam-se apenas as duas bandas próximas (genótipo AA).

Três das amostras analisadas (R26, R32, R42) apresentaram uma banda na zona correspondente à HbS e uma banda adicional logo abaixo da zona da HbF (Figura 5.13). Já as amostras R30 e R43 exibiram um padrão mais complexo, com uma banda na zona da HbS, uma banda extra abaixo dessa região, e uma terceira banda na zona da HbC (Figura 5.13). À primeira vista, este padrão poderia sugerir a presença de múltiplas variantes de hemoglobina ou um fenótipo composto envolvendo HbS e HbC; contudo, a presença simultânea de HbA nestas amostras exclui geneticamente esta última possibilidade, dado que indivíduos com HbS e HbC não apresentam HbA. Assim, o padrão observado é mais plausivelmente explicado pela existência de uma variante da cadeia alfa o que originaria, como já discutido, várias bandas devido às múltiplas combinações das cadeias para formar os vários tipos de hemoglobina. Nesse caso, as bandas perto das zonas da HbS e HbC poderiam não corresponder verdadeiramente a estas variantes, mas sim a diferentes hemoglobinas híbridas envolvendo cadeias α mutadas, que migram de forma semelhante às hemoglobinas S e C, levando a um padrão eletroforético que pode ser confundido com fenótipos compostos HbS/HbC. Ainda assim, não se pode excluir a hipótese da concomitância entre variantes da cadeia beta e alfa. Para todas estas amostras procedeu-se à realização do PCR-RFLP (Figura 5.14) para a pesquisa do SNP rs334, sendo que as amostras R30 e R43 demonstraram

ser AS e as restantes, AA. Deste modo, nas amostras AS, a banda observada na zona de migração da HbS corresponde efetivamente a esta variante, mantendo-se a hipótese da concomitância com uma variante da cadeia alfa. Já nas amostras AA, as bandas extra poderão estar relacionadas com uma variante da cadeia alfa.

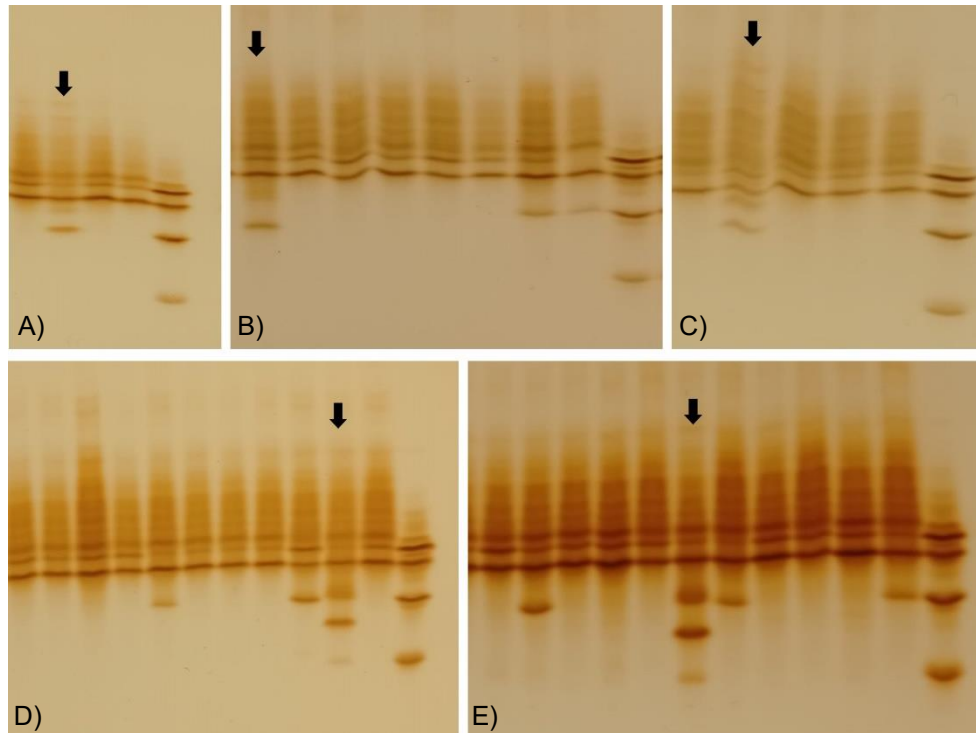


Figura 5.13: Focagens isoeletricas das amostras R26 (A), R32 (B), R42 (C), nas quais se observam duas bandas extra (na zona da HbS e abaixo da HbF) e das amostras R30 (D) e R43 (E), que exibem uma banda na zona da HbS, outra abaixo dessa região e uma terceira na zona da HbC.

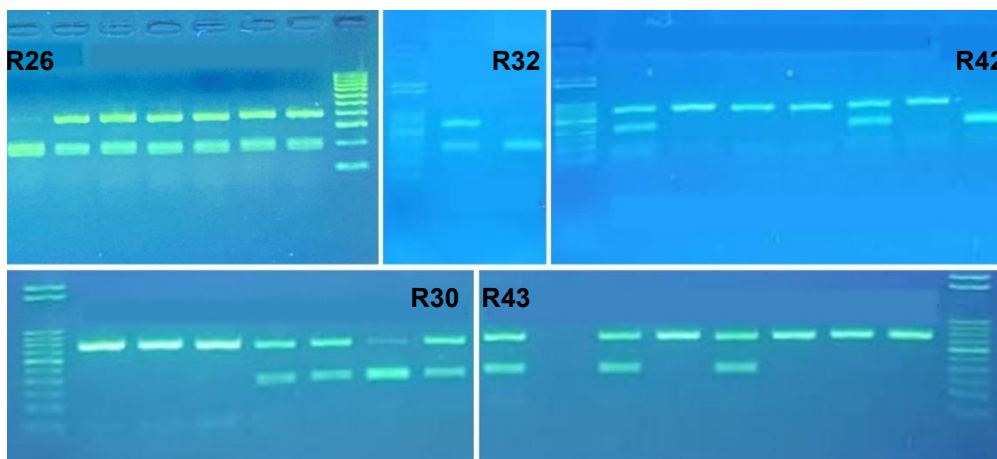


Figura 5.14: PCR-RFLP para pesquisa do SNP rs334 (HbS). As amostras R26, R32 e R42 revelaram ser AA. As amostras R30 e R43 revelaram ser AS.

Além de todas as referidas amostras com várias bandas extra, foram ainda identificados dois casos (R29 e R44) com uma única banda extra, situada imediatamente abaixo da HbF (Figura 5.15).

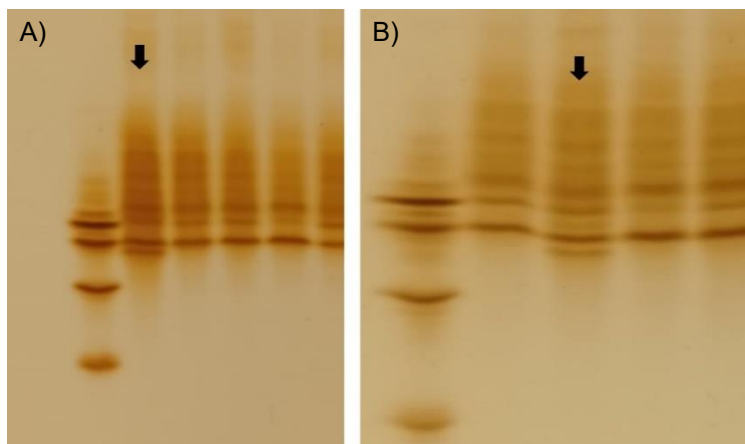


Figura 5.15: Focagens isoeletricas das amostras R29 (A) e R44 (B), identificadas pelas setas pretas, nas quais se observa uma banda extra abaixo da HbF.

Em todos estes últimos casos supracitados, dada a presença de bandas extra, foi considerada a sequenciação dos genes HBA.

Uma única amostra (R45) demonstrou a ausência de uma banda na zona característica da HbA, o que sugere a ausência total desse tipo de hemoglobina. Por outro lado, revelou uma banda perto da zona da HbS, outra abaixo dessa e, por fim, uma banda na zona de migração da HbC (Figura 5.16). A ausência de HbA, concomitantemente com a presença de bandas muito perto da zona da HbS e da HbC pode sugerir a coexistência de HbS com HbC, o que se traduz em Anemia Falciforme e justificaria a ausência de HbA. Estas duas variantes referidas tratam-se de alterações na cadeia beta da globina, contudo, dado que existe ainda uma banda extra entre a HbS e a HbC, é possível que se esteja perante a presença de uma variante da cadeia alfa, concomitante com as variantes beta. Porém, o PCR-RFLP para pesquisa do SNP rs334 nesta amostra refutou esta hipótese, tendo revelado o genótipo SS (Figura 5.17). Deste modo, não é possível que a HbC coexista com a HbS. Posto isto, hipotetiza-se a presença concomitante de HbS com uma variante na cadeia da alfa globina.

Para esta amostra, além da realização do PCR-RFLP, considerou-se a realização de sequenciação dos genes HBA, bem como a pesquisa da deleção $-\alpha 3.7^{kb}$, dada a sua elevada prevalência em Angola.

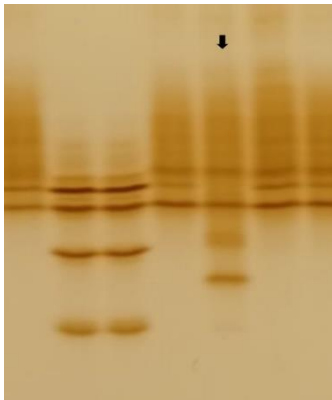


Figura 5.16: Focagem isoelétrica da amostra R45, identificada pela seta preta. Ausência de HbA, com a presença de bandas perto da zona da HbS e da HbC.

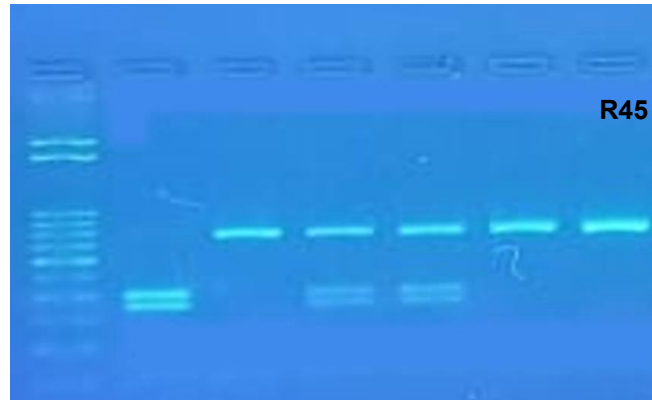


Figura 5.17: PCR-RFLP da amostra R45, que revelou ser SS.

Por fim, 4 amostras (R12, R15, R17 e R25) revelaram, na IEF, a presença de bandas na zona de migração da HbS, além das bandas esperadas correspondentes à HbA e HbF (Figura 5.18). Porém, o PCR-RFLP para pesquisa do SNP rs334 destas amostras revelou padrões atípicos, em detrimento do padrão típico esperado para o genótipo AS (Figura 5.19). Para além da banda de 377 pb, que corresponde ao alelo mutado, observam-se bandas adicionais cuja migração não corresponde exatamente com o padrão característico das bandas sobrepostas de 201 e 176 pb do alelo A. Verifica-se que uma das bandas aparenta ter um tamanho inferior ao esperado, situando-se ligeiramente abaixo da banda normalmente observada nos indivíduos AA ou AS típicos. Este fenómeno pode ocorrer devido a variações na digestão enzimática ou à presença de polimorfismos que alteram os locais de restrição da enzima. Outra possibilidade a considerar seria a presença de uma pequena deleção no exão 1 do gene HBB, não afetando o local de reconhecimento da enzima *Bsu36I*, usada no PCR-RFLP. Esta hipótese justificaria o padrão normal do genótipo AS no que diz respeito ao número de fragmentos, bem como a redução do tamanho de um dos fragmentos.

De forma a confirmar as possibilidades supracitadas, procedeu-se à sequenciação do gene HBB.

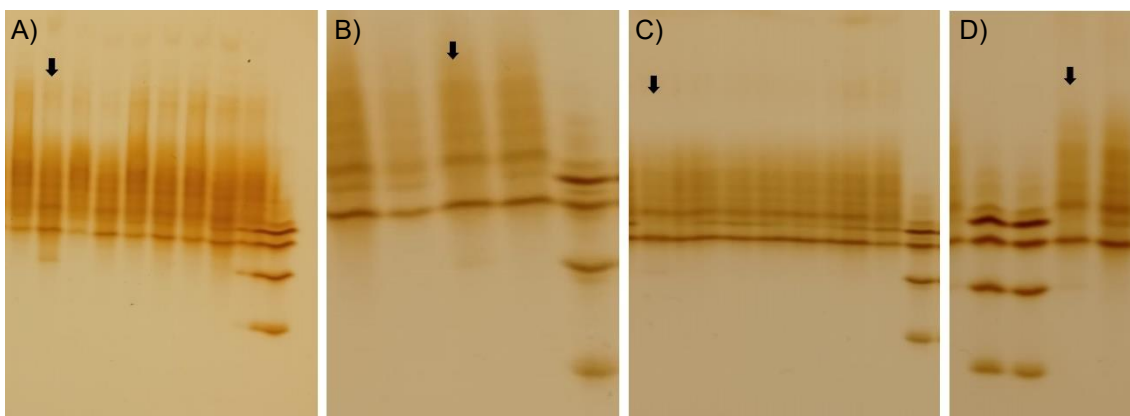


Figura 5.18: Focagens isoelétricas das amostras R15, R15, R17 e R25, identificadas pelas setas pretas. Bandas na zona da HbS.

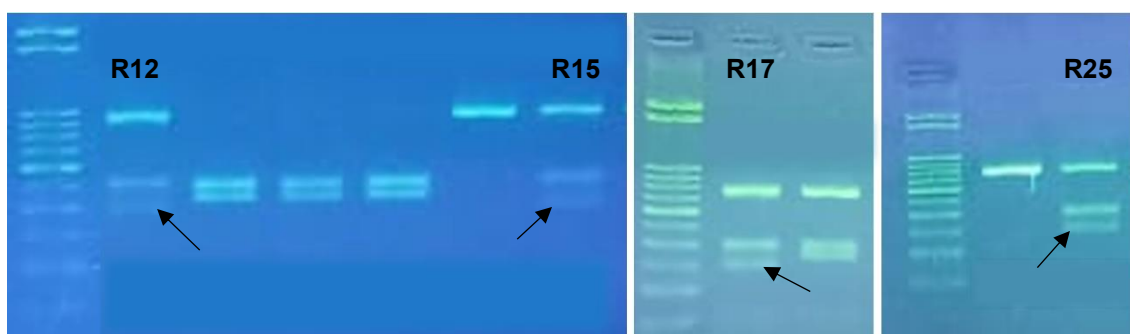


Figura 5.19: PCR-RFLP das amostras R12, R15, R17 e R25, que revelam um padrão de genótipo AS atípico, com uma banda e tamanho inferior ao esperado (seta preta).

5.2. AMPLIFICAÇÃO DOS GENES HBA E HBB POR PCR

Previamente à sequenciação dos genes HBA e HBB é necessário proceder à amplificação, por PCR, dos mesmos.

Enquanto a amplificação do gene HBB é relativamente simples, os genes HBA apresentam algumas particularidades que tornam o processo bastante mais complexo, constituindo-se como um desafio técnico significativo. Esta dificuldade está, em grande parte, associada à localização dos genes HBA numa região rica em guanina (G) e citosina (C) ($GC \approx 60\%$), com mais de 200kb de extensão [73], [106]. Esta elevada proporção de conteúdo GC tem tendência a promover a formação de estruturas secundárias estáveis no DNA, tais como “*hairpins*”, que interferem na reação de PCR, comprometendo a eficiência da mesma. Acresce ainda a presença de múltiplas repetições da família Alu e uma elevada densidade génica, ambas características que dificultam o desenho de primers específicos e comprometem a especificidade da

amplificação [106]. Além disso, existe uma elevada homologia entre os genes HBA1 e HBA2 (>96%) que diferem apenas no intrão 2 (IVS2) e nas suas regiões não codificantes 3', apresentando uma divergência de cerca de 17%.

Todas as particularidades referidas terão, certamente, contribuído para a falha na amplificação dos genes HBA1 e HBA2. Dada a utilização de controlos durante os protocolos, e o funcionamento desses protocolos em amostras de outros estudos em curso, foi possível excluir falhas da própria técnica como causa principal, sendo, portanto, as características intrínsecas da região alvo provavelmente responsáveis pela ineficiência da amplificação observada.

A deleção - α 3.7 kb, com elevada prevalência em África [51], [55], também foi tida em linha de conta como possível interferente na amplificação dos genes HBA. De facto, após a análise da sequência resultante da deleção concluiu-se que o *primer reverse* utilizado na amplificação do gene HBA2 (Quadro 4.9) deixa de conseguir ligar-se, pois a sua zona complementar encontra-se na região deletada. Já a utilização do *primer reverse* específico para o gene HBA1 (Quadro 4.9) permite a amplificação, na presença da deleção, de parte do gene HBA1 e parte do gene HBA2, não sendo possível distinguir através do gel de agarose se se trata do gene híbrido ou do gene HBA1, devido à semelhança de tamanhos dos fragmentos originados em ambos os casos.

Outra grande dificuldade encontrada prende-se com a natureza e qualidade das amostras em estudo. Foram utilizadas amostras de sangue seco em papel de filtro, que por si só apresentam uma qualidade inferior ao sangue total, particularmente no que diz respeito ao rendimento na extração de DNA e à integridade molecular do DNA. Além disso, há que ter em conta que as amostras pertencem a recém-nascidos, cujas gotas de sangue tendem a ser de volume reduzido. Acresce ainda o facto de as amostras utilizadas não serem recentes, dado que foram transportadas desde Angola e que não foi possível processá-las a todas de imediato após a chegada a Lisboa, o que agrava ainda mais a possível degradação do material genético. Posto isto, o tipo e a qualidade das amostras em si podem ter influenciado em grande parte os resultados negativos obtidos na fase de amplificação das amostras.

5.3. SEQUENCIAÇÃO DE SANGER

5.2.2. Sequenciação do gene HBB

Após a análise dos resultados da IEF, procedeu-se à sequenciação do gene HBB das amostras selecionadas para tal.

Nas amostras R1, R2, R4 e R22, como já referido, observou-se na IEF uma banda ténue na posição correspondente à HbS, tendo, posteriormente, o PCR-RFLP sugerido para todas as amostras o genótipo AA. Estes resultados indicam que as bandas observadas não correspondem à presença verdadeira de HbS, podendo tratar-se de artefactos técnicos ou de outra variante de hemoglobina com ponto isoelétrico semelhante ao da HbS.

Algumas das hemoglobinas que migram, na IEF, perto da HbS são a Hb Rush (rs33966487), G-Ferrara (rs35278874), Maputo (rs33932070), Stanleyville-II, Hasharon, Ottawa, St Luke's e Etobicoke [107]. As três primeiras referidas são originadas por mutações no gene HBB, todas localizadas no exão 2 [107], [108], [109], o que justificou a sequenciação dos exões 1 e 2 do gene HBB nas amostras em causa. Porém, não foi identificada nenhuma das variantes listadas, não sendo, por isso, responsáveis pelas bandas observadas na IEF. Os resultados da sequenciação confirmaram igualmente a ausência da HbS. As restantes hemoglobinas mencionadas - Stanleyville-II, Hasharon, Ottawa, St Luke's e Etobicoke - são variantes da cadeia alfa [74], cuja presença não foi avaliada por método moleculares nestas amostras dado que, tratando-se de heterozigotia em genes da alfa-globina, seriam esperadas bandas adicionais no traçado da IEF, o que não se verificou.

Nas amostras R9, R13, R19 e R20 suspeitou-se da presença concomitante de HbS e β -talassemia, tendo em conta que na IEF a banda correspondente à HbS apresentava maior intensidade que a da HbA, sugerindo uma possível redução na síntese da cadeia beta normal. De forma a explorar esta possibilidade, foi realizada inicialmente a sequenciação dos exões 1 e 2 do gene HBB, dado que é nestes que ocorre a maioria das mutações responsáveis pelas formas típicas, herdadas recessivamente, de β -talassemia, que são as mais comuns em regiões endémicas de malária, como Angola [26]. Já as variantes dominantes são raras, de ocorrência esporádica e geralmente associadas ao exão 3 [110]. Assim, dada a menor probabilidade de conter mutações, e de forma a economizar e otimizar recursos, o exão 3 não foi inicialmente sequenciado.

No entanto, a sequenciação dos exões 1 e 2 do gene HBB nestas amostras não revelou a presença de mutações associadas a variantes de hemoglobina, à exceção da HbS, que foi confirmada, em heterozigotia, em todas as amostras pela análise dos cromatogramas, nos quais se verificou o traçado observado na Figura 5.20. Nos referidos cromatogramas é evidenciada a sobreposição dos picos correspondentes às bases A e T (c.20A>T).

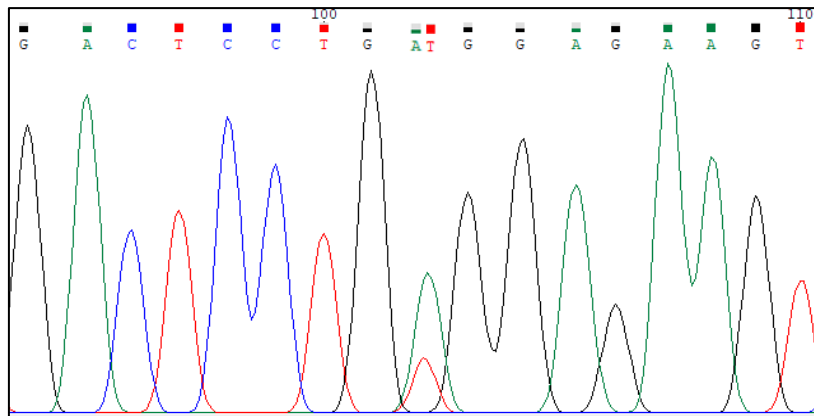


Figura 5.20: Cromatograma da sequenciação dos exões 1 e 2 do gene HBB, evidenciando o SNP rs334 (HBB: c.20A>T), em heterozigotia, responsável pela HbS.

Por outro lado, a amostra R13 apresenta um polimorfismo no gene HBB, correspondente ao rs10768683 (HBB.c.315+16G>C) [111]. Esta é uma variante intrónica localizada no segundo exão do gene HBB. A amostra é heterozigótica para este SNP, apresentando os alelos G (alelo referência) e C (Figura 5.21). No presente estudo, o alelo C foi o mais frequentemente identificado, ainda que em populações africanas esse seja o menos comum [111], [112].

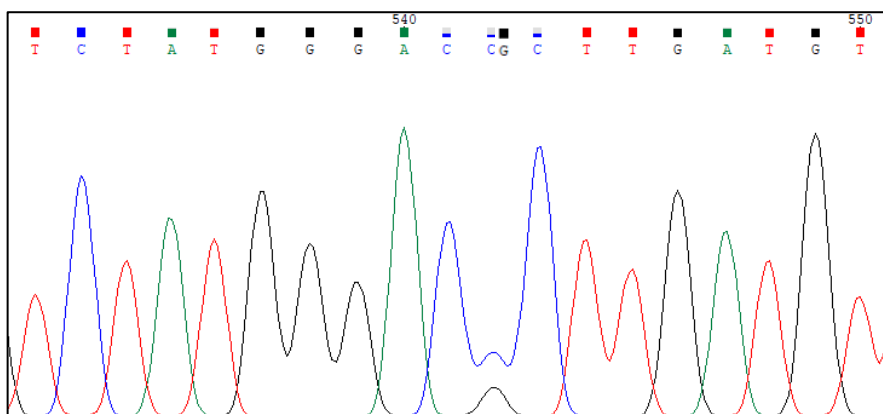


Figura 5.21: Cromatograma da sequenciação dos exões 1 e 2 do gene HBB, evidenciando o SNP rs10768683 (HBB.c.315+16G>C) em heterozigotia.

Como já mencionado, além deste SNP, esta amostra possui também HbS, associação esta que tem sido descrita na literatura [113]. Tem vindo ainda a ser reportado que algumas variantes, embora classificadas isoladamente como benignas, podem alterar o fenótipo dos portadores quando combinadas com HbS, conduzindo, eventualmente, a quadros patológicos. Uçucu *et al.* [113], num estudo levado a cabo em 2022, identificaram um indivíduo com traço falciforme que era portador do SNP rs10768683 [112] e de um outro, ambos classificados como benignos. Contudo, nesse estudo os autores concluíram que pelo menos um desses SNP, quando associado com HbS provoca um quadro de HbS/ β -talassemia, com valores hematológicos compatíveis com o mesmo. Além disso, o doente referido nesse estudo é dependente de transfusões e atravessa crises de dor [113]. De facto, esta hipótese poderia justificar os resultados evidenciados pela IEF da amostra R13, porém, o estudo de Uçucu *et al.* [113], bem como as suas conclusões, apresentam algumas limitações, nomeadamente o facto de não terem sido investigadas mutações na cadeia alfa, que poderiam justificar o fenótipo do indivíduo em causa. Além disso, a hipótese aqui discutida não poderia justificar o resultados das restantes amostras com padrão de IEF semelhante (R9, R19 e R20), dado que não possuem HbS.

Dado este cenário, procedeu-se à sequenciação do 3º exão do gene HBB, de forma a excluir a presença de mutações responsáveis por β -talassemia no mesmo. No entanto, não foram identificadas mutações neste exão.

Posto isto, apesar deste achado na amostra R13 e da exclusão de mutações no gene HBB nas amostras R9, R19 e R20, permanece por esclarecer a razão subjacente à superior intensidade da banda correspondente à HbS relativamente à HbA na IEF. Não é possível excluir a possibilidade de que este fenómeno resulte de artefactos da própria técnica de IEF ou mesmo de fatores relacionados com a amostra. Idealmente proceder-se-ia à repetição da IEF das amostras e/ou à análise por métodos complementares como a Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC), que permitiria dosear as frações de hemoglobina. Contudo, tal não foi possível dada a quantidade limitada de amostra, a impossibilidade de fazer nova colheita e ainda a falta de disponibilidade financeira para realizar métodos analíticos adicionais, como a HPLC. Este *outcome* reforça a necessidade de incluir abordagens adicionais em estudos futuros.

Nas amostras R3, R6, R7, R8, R18, R10, R11, R14, R21, R23 e R24, nas quais se verificou a presença de uma banda na zona da HbC, procedeu-se à sequenciação dos dois primeiros exões do gene HBB. Na maioria destas amostras, mais concretamente nas amostras R7, R8, R18, R10, R11, R21, R23 e R24, foi confirmada a mutação

responsável pela HbC (rs33930165), que se encontrava claramente visível nos cromatogramas, em heterozigotia, apresentando o padrão característico com sobreposição dos picos correspondentes às bases A e G na posição c.19G>A do gene HBB (Figura 5.22).

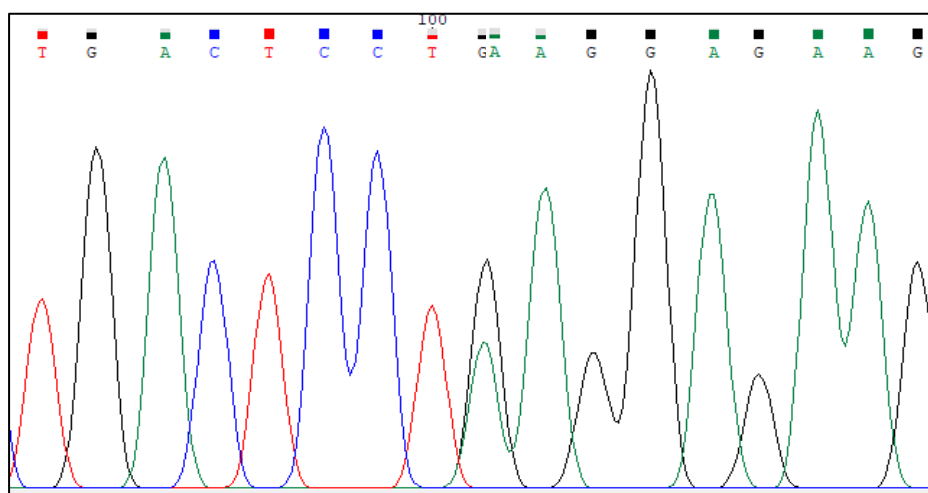


Figura 5.22: Cromatograma da sequenciação dos exões 1 e 2 do gene HBB, evidenciando, em heterozigotia, o SNP rs33930165 (HBB.c.19G>A), responsável pela HbC.

Assim, nestas amostras confirmou-se a presença de hemoglobina normal (HbA) em coexistência com a HbC, ou seja, trata-se do genótipo HbA/HbC. Porém, este não é um achado alarmante, dado que os indivíduos com esta condição são assintomáticos, não necessitando de acompanhamento médico especializado [58], [102], ao contrário de indivíduos homozigóticos para esta variante, que podem apresentar esplenomegália, icterícia e hemólise crónica.

Quanto à amostra R14, não se detetou a mutação responsável pela HbC, mas sim pela hemoglobina E (HbE) (rs33950507) [114], tendo-se verificado no cromatograma o padrão característico da heterozigotia para esta variante, com a sobreposição dos picos das bases A e G (Figura 5.23). Estas duas variantes possuem pontos isoelétricos próximos, o que justifica que tenham sido confundidas na IEF [1]. Contudo, uma observação mais cuidada da IEF desta amostra (Figura 5.8 H), revela que, de facto, a banda observada parece situar-se ligeiramente acima da banda HbC do controlo. Assim, o recém-nascido identificado como R14 é heterozigótico para a HbE, possuindo o genótipo HbA/HbE.

A HbE consiste numa variante estrutural comum da cadeia beta da hemoglobina, resultante de uma mutação pontual no gene HBB (c.79G>A), que conduz à substituição

do aminoácido glutâmico por uma lisina na posição 26 da cadeia (β -Glu26Lys) [115]. Esta alteração traduz-se numa molécula de hemoglobina instável, que pode ser laboratorialmente evidenciada pela tendência a formar corpos de Heinz em situações de stress oxidativo, espelhando a sua maior suscetibilidade à degradação celular [115]. Consequentemente, ocorre uma diminuição da produção da β -globina, levando, portanto, a um fenótipo ligeiro de β -talassemia [115], [116].

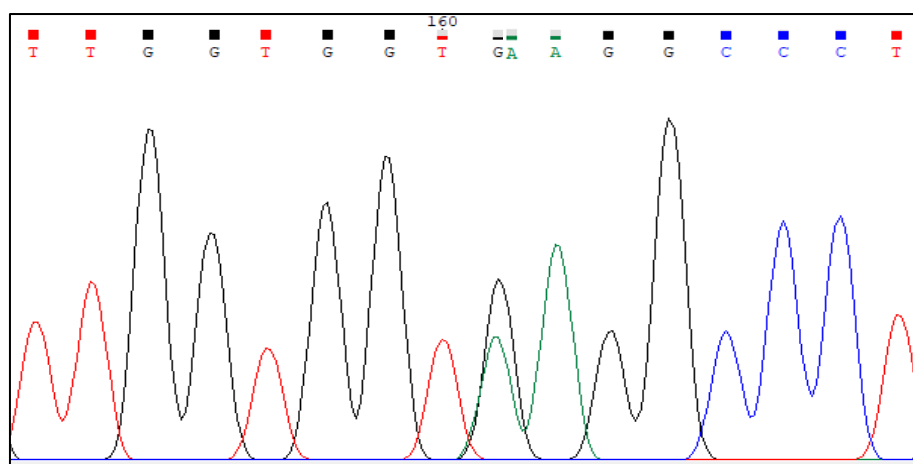


Figura 5.23: Cromatograma da sequenciação dos exões 1 e 2 do gene HBB, evidenciando, em heterozigotia, o SNP rs33950507 (HBB. c.79G>A), responsável pela HbE.

A heterozigotia para a HbE, como é o caso do recém-nascido R14, é geralmente assintomática, não sendo associada a anemia grave [115], [117]. Nestes indivíduos, a HbE representa apenas aproximadamente 25 a 30% da hemoglobina total [117]. Além disso, as alterações morfológicas dos eritrócitos são mínimas e os índices hematimétricos revelam apenas ligeira microcitose. Assim, a presença de HbE torna-se crítica quando ocorre em interação com outras hemoglobinopatias, nomeadamente com β -talassemia, o que é bastante comum no Sudeste Asiático, Camboja, Laos e Tailândia, onde a HbE chega a atingir frequências populacionais superiores a 50% em algumas regiões endémicas de malária [116], [117]. De facto, na Ásia a HbE apresenta uma prevalência extremamente elevada e superior a qualquer outra região do mundo, sendo considerada um “marco genético” da região [118]. A identificação desta variante na amostra R14, correspondente a um recém-nascido de origem africana, é um achado relevante que poderá estar associado a fenómenos de migração populacional, ancestralidade asiática ou até mesmo à eventual contribuição genética de um progenitor de origem asiática. Estes fenómenos têm vindo a ser progressivamente reconhecidos como responsáveis pela presença de variantes hemoglobínicas típicas de determinadas

regiões noutras áreas geográficas. Isto reforça a importância da análise molecular complementar em programas de rastreio, permitindo uma correta identificação e caracterização das variantes hemoglobínicas, mesmo quando ocorrem fora dos contextos geográficos esperados.

Já nas amostras R3 e R6, que na IEF apresentaram bandas ténues na zona da HbC, não se confirmou a presença dessa variante nem de qualquer outra em nenhum dos 3 exões do gene HBB. A hemoglobina A₂ (HbA₂), durante o período neonatal apresenta geralmente valores inferiores a 1%, aumentando gradualmente ao longo das primeiras semanas de vida [76], [119] até atingirem os valores típicos dos adultos. Dado que esta hemoglobina migra muito perto da zona da HbC, devido aos seus pontos isoelétricos semelhantes [1], é plausível que as bandas observadas se devam à presença deste tipo normal de hemoglobina. Embora a literatura afirme que a HbA₂ se torna visível na IEF com maior fiabilidade após o 11º dia [73] de vida, no presente estudo levado a cabo em África, não foi possível garantir que todas as colheitas fossem realizadas imediatamente após o parto. Sabe-se que algumas foram efetivamente colhidas aquando da vacinação, já após os 11 dias de vida, não se podendo assim excluir a possibilidade da presença de HbA₂ em algumas amostras.

Níveis aumentados de HbA₂ são uma das principais características da heterozigotia para β-talassemia [120], no entanto, o facto de não terem sido identificadas mutações no gene HBB torna essa hipótese pouco provável. Não obstante a ausência de mutações na região sequenciada, a região promotora não foi sequenciada, apesar de serem conhecidas mutações nessa zona com impacto na expressão da β-globina e responsáveis pelo surgimento de β-talassemia, como por exemplo a variante HBB: c. -29A>G (rs34598529) [121], [122], [123], que tem sido identificada em indivíduos com ancestralidade africana. Assim, não se pode excluir totalmente a presença de variantes nessa região que justifiquem o fenótipo observado.

É ainda pertinente referir que existem relatos, embora que raros, do aumento isolado de HbA₂ em indivíduos sem mutações no gene HBB, possivelmente associado a alterações regulatórias não identificadas [124]. Assim, caso no presente estudo não houvesse quaisquer limitações quanto às tecnologias de diagnóstico disponíveis, seria relevante investigar a presença de HbA₂ com recurso a técnicas como HPLC.

A possibilidade de as bandas observadas se tratarem artefactos da técnica deve ser igualmente considerada, sobretudo tendo em conta o facto de as bandas serem muito ténues, especialmente da amostra R3. De facto, uma das desvantagens da IEF prende-se com a possibilidade de contaminações durante o processo, o que pode conduzir a

interpretações subjetivas ou incorretas [73]. Este tipo de contaminações pode ocorrer pelo contacto do cartão de sangue seco com outras amostras, ou ainda pela sobreposição ou difusão de proteínas entre poços adjacentes no gel.

Para concluir o conjunto de amostras submetidas à sequenciação do gene HBB, importa discutir os resultados das amostras R5 e R16, que demonstraram a presença de bandas ligeiramente abaixo da zona habitualmente correspondente à HbS. No entanto, o PCR-RFLP revelou o genótipo AA, ou seja, a ausência da mutação responsável pela HbS. De facto, este achado foi confirmado pela sequenciação dos exões 1, 2 e 3 do gene HBB, que não evidenciou qualquer mutação, nomeadamente a associada à HbS. Não obstante a ausência de mutações patogénicas, no exão 3 da amostra R16 foi identificada a substituição de um C por um T (Figura 5.24), correspondente ao rs36020563 (HBB: c.432C>T) [125]. Esta consiste numa variante sinónima benigna, já que não ocorre uma alteração do aminoácido codificado, pois o codão CAC, torna-se CAT, codificando ambos o aminoácido Histidina [125]. Além disso, esta variante não altera a mobilidade eletroforética na IEF.

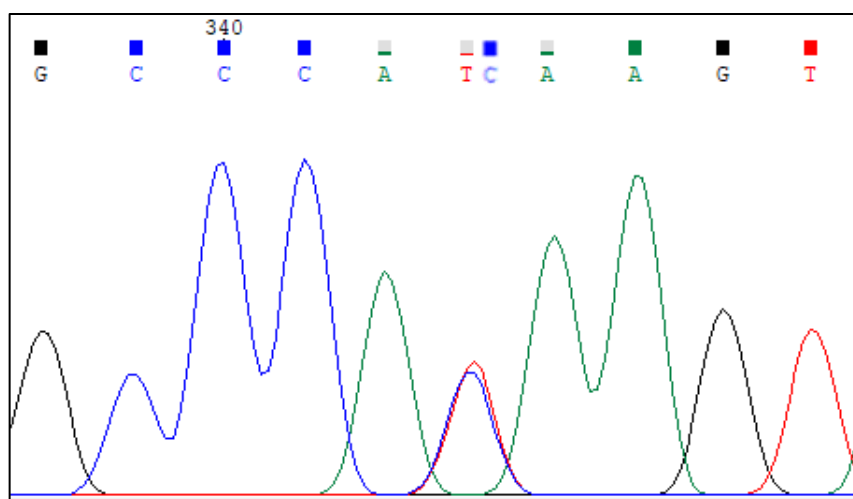


Figura 5.24: Cromatograma da sequenciação do exão 3 do gene HBB, evidenciando o SNP rs36020563 (HBB: c.432C>T).

Desta forma, os resultados destas amostras apresentam uma grande semelhança com os já discutidos relativamente às amostras R1, R2, R4 e R22, nas quais foram detetadas bandas na zona da HbS, sem que tal se tenha confirmado a nível molecular. A única diferença entre estes dois conjuntos de amostras reside no facto de, na IEF, as bandas das amostras R5 e R16 se posicionarem ligeiramente abaixo daquelas das restantes amostras citadas. No entanto, por se encontrarem tão perto da zona da HbS, é

pertinente aplicar a estas amostras o mesmo raciocínio já seguido anteriormente para as amostras R1, R2, R4 e R22.

As amostras R12, R15, R17 e R25 demonstraram padrões AS atípicos no gel de agarose do PCR-RFLP, tal como discutido. Em detrimento do padrão típico com fragmentos de 377 pb (alelo S não digerido), 201 e 176 pb (alelo A digerido), observou-se, além dos fragmentos de 377 pb e de 201 pb, um fragmento com migração ligeiramente inferior ao esperado para os 176 pb, sugerindo a existência de um fragmento mais pequeno.

Este padrão atípico poderia ser explicado por diversos fatores. Uma das possibilidades prendia-se com a presença de uma eventual deleção no exão 1 do gene HBB, que não afetasse, no entanto, o local de restrição da enzima *Bsu36I*. Porém, este fenómeno provocaria um desfasamento na grelha de leitura da sequenciação do gene HBB, resultando na sobreposição de picos a partir do ponto da deleção. Contudo, isto não se verificou, pelo que se excluiu a presença de uma deleção. A presença de polimorfismos capazes de modificar os locais de restrição da enzima, na região amplificada durante o PCR-RFLP, também poderia justificar os resultados obtidos. A análise do cromatograma resultante da sequenciação do gene HBB não revelou, no entanto, a presença de nenhum polimorfismo que afetasse os locais de restrição da enzima, tendo-se confirmado apenas a presença da HbS (rs334) em heterozigotia. Por outro lado, verifica-se que os *primers* usados no PCR-RFLP (Quadro 4.1) abrangem uma região que não é coberta pelos *primers* usados na amplificação do gene HBB (Quadro 4.5), como se pode observar na Figura 5.25.

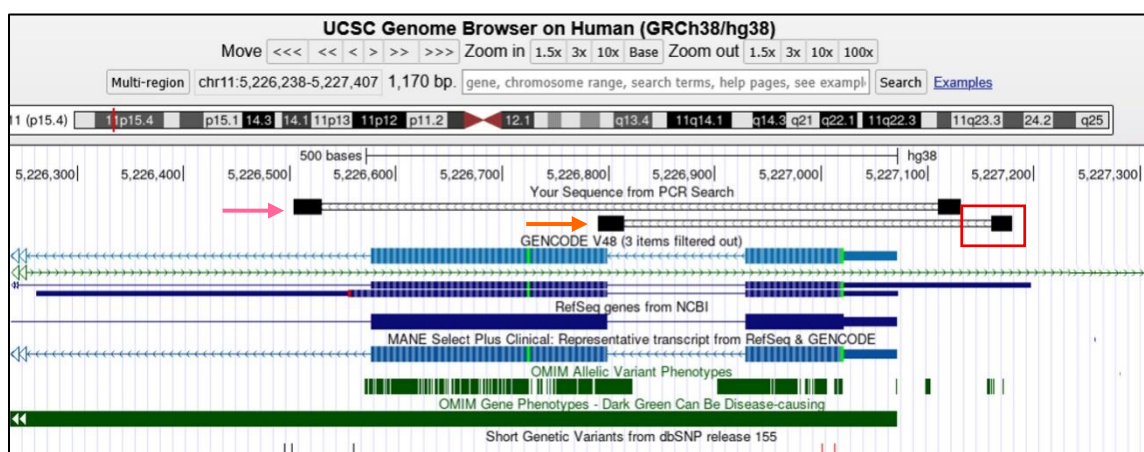


Figura 5.25: Localização genómica das regiões amplificadas usando os *primers* do PCR-RFLP (seta laranja) e os da amplificação/sequenciação do gene HBB (seta rosa). O objetivo da sequenciação usando os *primers* do PCR-RFLP é investigar a zona destacada a vermelho. Fonte: UCSC Genome Browser [126].

Assim, apenas com base nestes resultados não é possível excluir a presença de um polimorfismo na zona não abrangida pelo protocolo de sequenciação inicial. Deste modo, com o objetivo de analisar diretamente a região que estava fora do alcance da sequenciação inicial, procedeu-se à sequenciação das amostras usando o *primer reverse* do PCR-RFLP.

Esta segunda sequenciação revelou, além do SNP rs334 responsável pela HbS, a presença de um SNP adicional em heterozigotia na região amplificada (Figura 5.26), o qual cria um novo local de restrição para a enzima *Bsu36I*. O SNP detetado corresponde ao rs72561473 (HBB: c.-133G>A) [127], que é relativamente comum em África [128]. Esta variante encontra-se numa região não codificante, a jusante da região altamente conservada CACCC. Em 2014, um estudo conduzido por Waye *et.al* [128] analisou o impacto clínico deste SNP, tendo sido recolhidos dados de vários pacientes tanto heterozigóticos para a mutação, como heterozigóticos compostos para a mesma e HbS. Os resultados do referido estudo comprovaram que o rs72561473 não se encontra associado a um fenótipo talassémico. Esta variante encontra-se ainda classificado como benigna nas bases de dados dbSNP e ClinVar, não estando associada a qualquer condição clínica relevante.

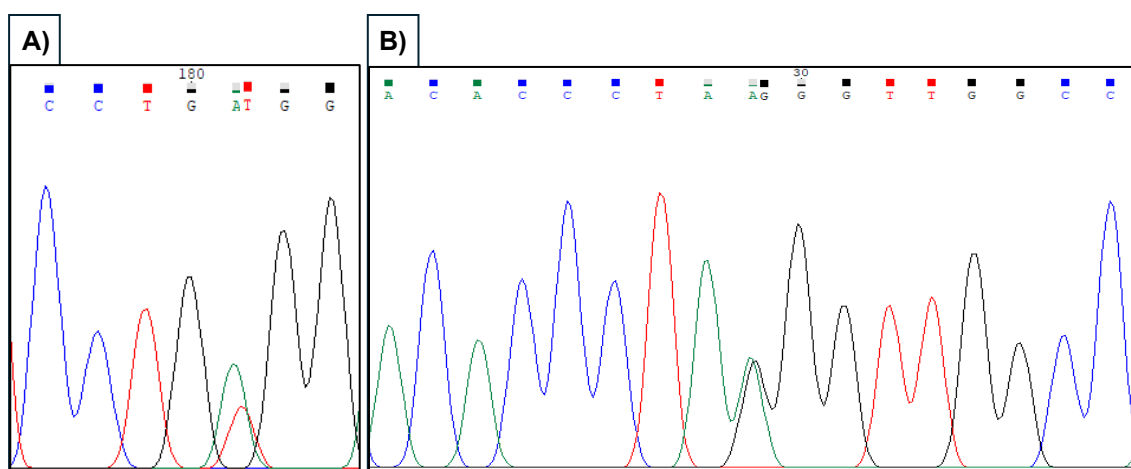


Figura 5.26: Cromatograma da sequenciação do gene HBB usando o *primer reverse* do PCR-RFLP, evidenciando, (A) o SNP rs334 (HBB: c.20A>T), em heterozigotia, responsável pela HbS e (B) o SNP rs72561473 (HBB: c.-133G>A). Verifica-se que este SNP cria um novo local de restrição da enzima *Bsu36I* (5' CC↓TNAGG 3').

Retornando aos resultados atípicos do gel, importa realçar que, como o fragmento de 377 pb, correspondente ao alelo com HbS (rs334), permanece inalterado nestas amostras, conclui-se que o SNP adicional se encontra no alelo sem mutação HbS, ou

seja, no alelo A (*Wild type*). Assim, estas amostras apresentam um alelo mutado para HbS e um alelo A com a presença do SNP rs72561473.

Recorrendo à ferramenta online NEBcutter (V3.0.30), analisou-se a sequência nucleotídica amplificada pelos *primers* do PCR-RFLP no caso de ausência de HbS e presença do SNP rs72561473, ou seja, com a substituição de um G por um A. Esta análise previu a formação dos seguintes fragmentos após digestão: 201 pb, 152 pb, 24 pb e 13 pb (Figura 5.27). Os fragmentos mais pequenos, de 13 e 24 pb, são demasiado curtos para serem observados no gel, já os fragmentos de 201 e 152 pb são compatíveis com o padrão observado. Depreende-se assim, que o fragmento de 152 pb corresponde à banda que migra ligeiramente abaixo dos habituais 176 pb, explicando assim o padrão atípico.

#	Ends	Coordinates	Length (bp)
1	(LeftEnd) - Bsu36I	1-24	24
2	Bsu36I - Bsu36I	25-377	353
3	Bsu36I - (RightEnd)	378-390	13

Figura 5.27: Previsão obtida no NEBCutter (v3.020) dos fragmentos originados através da digestão com a enzima de restrição *Bsu36I*, na sequência não mutada para HbS, mas com o SNP rs72561473.

A análise molecular do gene HBB permitiu confirmar diversas variantes estruturais previamente suspeitadas com base nos perfis de Focagem Isoelétrica, nomeadamente as variantes HbC, HbE e HbS em várias amostras. Nas amostras suspeitas de HbS ou HbC, a ausência de mutações no gene HBB permitiu descartar com confiança a presença destas variantes, evitando diagnósticos imprecisos e sugerindo que os perfis observados poderão ter origem em artefactos técnicos ou, nalguns casos, na presença de hemoglobinas fisiológicas, como a HbA2. A deteção de variantes raras e não esperadas na região geográfica de Angola, como a HbE, realça a importância de abordagens integradas nos programas de rastreio neonatal e de análises alargadas que considerem fenómenos de migração e ancestralidade genética diversa, não se focando restritamente na HbS. Além disso, a deteção de vários polimorfismos, ainda que benignos, evidencia a diversidade genética subjacente às amostras analisadas.

Por fim, a inexistência de mutações em algumas amostras sugere que seria desejável proceder, sempre que possível, à análise de regiões promotoras, genes da cadeia α e

recurso a métodos complementares, como Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPL) ou Eletroforese Capilar (EC).

Ainda que os resultados da sequenciação do gene HBB tenham contribuído para confirmar ou excluir a presença de variantes estruturais de hemoglobina em algumas amostras, noutras amostras mostraram-se inconclusivos, o que aponta para a necessidade de abordagens mais amplas.

5.2.2.1. Identificação de Polimorfismos de Nucleótido Único (SNPs) com elevada heterozigosidade

Durante a análise dos resultados de sequenciação do gene HBB foram identificados alguns SNPs não responsáveis por variantes estruturais de hemoglobina, mas que apresentavam elevada heterozigosidade, nomeadamente os rs10768683 (HBB:c.315+16G>C) e rs713040 (HBB:c.9T>C). Estes dois SNPs foram detetados em várias amostras, pelo que foi realizada a sua verificação sistemática em todas as amostras analisadas, tendo-se registado os alelos presentes em cada uma.

Ambos os SNPs identificados foram objeto de pesquisa na literatura científica, bem como nas bases de dados ClinVar e dbSNP, de modo a avaliar a sua frequência e relevância clínica.

Como já mencionado anteriormente, o rs10768683, consiste numa variante intrónica localizada no segundo exão do gene HBB [112]. Não se encontra associado a variantes estruturais de hemoglobina e está reportado como benigno nas principais bases de dados genéticos, como o ClinVar e dbSNP [111], [112].

Este SNP tem sido comumente identificado em estudos no âmbito das hemoglobinopatias. Contudo, alguns resultados não têm sido concordantes com o descrito nas bases de dados quanto ao seu significado clínico. Um estudo conduzido numa população sul iraniana evidenciou uma associação estatisticamente significativa entre o genótipo GC no rs10768683 e a ocorrência de Talassemia dependente de transfusões, sugerindo que indivíduos heterozigóticos possam apresentar um maior risco de desenvolver uma forma severa da doença [129]. Contudo, outros autores relatam a inexistência de associações significativas entre esse SNP e Talassemia [130]. Já Uçucu *et al.* [113] discutem a sua eventual patogénica quando em combinação com variantes estruturais, como a HbS, não conseguindo, no entanto, fornecer dados suficientemente claros quanto a essa mesma associação, como já discutido durante a análise dos resultados da amostra R13.

O alelo C é o de referência e de menor frequência (MAF = 0.28), enquanto o G é o alelo alternativo [111], [112]. Das 25 amostras cujo gene HBB foi sequenciado, 6 (24%) apresentaram heterozigotia (GC) no SNP rs10768683, enquanto as restantes apresentaram homozigotia (CC), como se verifica no quadro 5.1, sendo este um facto curioso, tendo em consideração que o alelo C também é o menos frequente em África.

Este SNP tem sido frequentemente encontrado em associação com um outro, o rs713040 [131], o que sugere que esses dois tendem a ser herdados juntos, havendo uma ligação genética entre eles [132].

O SNP rs713040, segundo bases de dados como o *Ensembl* e dbSNP, consiste numa variante benigna [131], [133], na qual o codão CAT é alterado para CAC, traduzindo-se então numa mutação sinónima, por não resultar numa alteração proteica [134]. O alelo de referência é o T, apresentando menor frequência que o alelo alternativo C, inclusive em África. No presente estudo, das 25 amostras analisadas, a maioria (13) apresentou, como expectável, homozigotia (CC) para o referido SNP. As restantes 6 amostras demonstraram ser heterozigóticas (TC), como descrito no quadro 5.1.

Na Figura 5.28 encontram-se os cromatogramas correspondentes a cada genótipo referido dos SNP em estudo.

Embora se encontre descrito como benigno, este SNP tem sido indicado como bastante prevalente em indivíduos com β -talassemia [135], o que por si só não significa que exista uma verdadeira associação entre esta condição e o referido SNP. Isto porque dada a sua elevada frequência, é expectável que seja igualmente frequente entre indivíduos com β -talassemia. Contudo, um estudo desenvolvido no Iraque aferiu que o rs713040 pode estar associado a um risco aumentado para β -talassemia, havendo diferenças fisiológicas entre os indivíduos portadores desta variante e os controlos normais [136].

Posto isto, e dados os resultados da literatura contraditórios quanto ao significado clínico destas variantes, aprofundar os estudos acerca destes SNP, em particular numa vertente mais clínica, seria bastante pertinente. Isso contribuiria para esclarecer o verdadeiro papel destas variantes e definir se a sua identificação deve ser prioritária em contextos de rastreios de hemoglobinopatias.

Quadro 5.1: Genótipos identificados nos rs10768683 e rs713040 no gene HBB

Genótipo das amostras no SNP rs10768683				Genótipo das amostras no SNP rs713040			
R1	GC	R14	CC	R1	TC	R14	CC
R2	GC	R15	CC	R2	TC	R15	CC
R3	CC	R16	CC	R3	CC	R16	CC
R4	CC	R17	CC	R4	CC	R17	CC
R5	GC	R18	CC	R5	TC	R18	CC
R6	CC	R19	CC	R6	CC	R19	CC
R7	CC	R20	CC	R7	CC	R20	CC
R8	CC	R21	GC	R8	CC	R21	TC
R9	CC	R22	CC	R9	CC	R22	CC
R10	CC	R23	GC	R10	CC	R23	TC
R11	CC	R24	CC	R11	CC	R24	TC
R12	CC	R25	CC	R12	CC	R25	CC
R13	GC	----	----	R13	TC	----	----

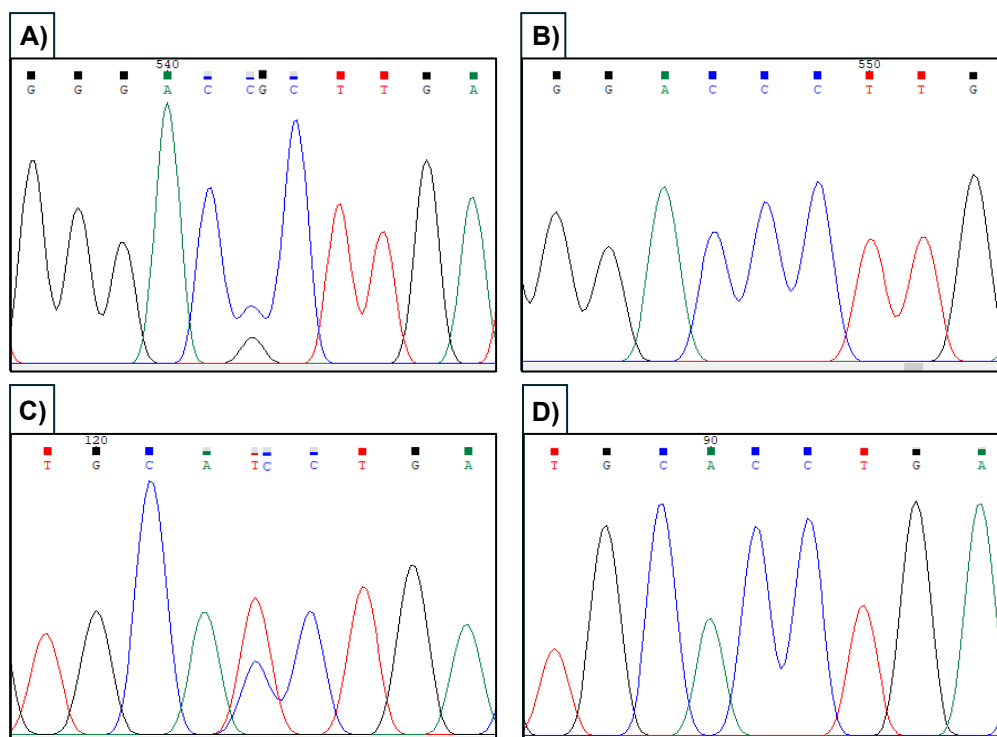


Figura 5.28: Cromatogramas representativos dos vários genótipos observados nos SNP rs10768683 (HBB:c.315+16G>C) e rs713040 (HBB:c.9T>C). (A) rs10768683 (genótipo GC); (B) rs10768683 (genótipo CC); (C) rs713040 (genótipo TC); (D) rs713040 (genótipo CC).

5.2.3. Sequenciação dos genes HBA

A sequenciação dos genes HBA1 e HBA2 estava prevista para inúmeras amostras, nomeadamente para aquelas que apresentavam bandas extra na Focagem Isoelétrica. Contudo, na maioria das amostras não foi possível proceder à sequenciação devido aos fatores já discutidos no capítulo 5.2.

Deste modo, apenas foi possível obter resultados da sequenciação para o gene HBA2 de 7 amostras, não tendo sido possível realizar a sequenciação do gene HBA1. As amostras sequenciadas foram as R26, R27, R28, R29, R30, R31 e R32.

Primeiramente procedeu-se à análise do alinhamento das sequências obtidas pela sequenciação de todas as amostras, com as sequências de referência de cada um dos três exões do gene HBA2, extraídas do *Ensembl* (ENST00000251595.11). Esta primeira análise foi crucial para confirmar que efetivamente tinham sido sequenciados na íntegra os três exões do gene em estudo. A análise demonstrou um alinhamento completo com a sequência de referência ao longo da maioria da extensão de cada exão (Figura 5.29). Apenas na região terminal do terceiro exão se observaram alguns desalinhamentos, os quais se interpretam como prováveis artefactos da própria sequenciação, uma vez que coincidem com a extremidade final da leitura, zona habitualmente associada a maior probabilidade de erros técnicos. Logo após, passou-se à análise dos cromatogramas, com o objetivo de localizar eventuais mutações.

No que diz respeito às doze amostras cuja principal suspeita se tratava da presença da hemoglobina G-Philadelphia (HbG^{ph}), apenas foi possível sequenciar para o gene HBA2 as amostras R27, R28 e R31. Porém, não foi identificada nenhuma mutação nos cromatogramas, incluindo aquela associada à HbG^{ph}, que era considerada a hipótese mais provável, como visto no capítulo 5.1. Conforme ilustrado na Figura 5.30, na região correspondente à mutação responsável pela variante referida, encontra-se o codão AAC, que codifica o aminoácido Asparagina, tal como é expectável em amostras normais. Esta achado contrasta com o aminoácido Lisina e cuja presença confirmaria a existência da referida variante. Assim, os resultados da análise dos cromatogramas refutam a possibilidade da presença da HbG^{ph}.

Relativamente às amostras R26, R30 e R32, todas apresentaram padrões complexos com a presença de bandas extra na Focagem Isoelétrica. Apesar de todas elas terem apresentado bandas na zona da HbS, apenas a amostra R30 revelou a sua presença no PCR-RFLP, o que levanta a hipótese de que as bandas nessa zona não correspondem, de facto, à HbS, mas sim a outras variantes com mobilidade semelhante, nomeadamente variantes da cadeia α .

Inicialmente, a presença de múltiplas bandas foi associada à presença de eventuais variantes da cadeia α , dado que esta participa de todas as hemoglobinas, o que poderia originar diferentes hemoglobinas híbridas. Contudo, a ausência de mutações no gene HBA2 nestas amostras exclui a presença de variantes da cadeia α codificadas por esse mesmo gene. Ainda assim, como previamente referido, não foi possível obter resultados da sequenciação do gene HBA1, o que se traduz numa limitação considerável deste estudo. Assim, não é possível excluir de forma definitiva a presença de mutações da cadeia α .

Posto este cenário, e principalmente tendo em conta que a amostra R30 apresentou uma banda na zona da HbC, dever-se-ia ter considerado a presença de variantes da cadeia β , além da HbS. Torna-se assim evidente que a abordagem destas amostras, baseada exclusivamente na sequenciação do gene HBA2 não é suficiente para esclarecer padrões eletroforéticos complexos.

Por fim, no caso da amostra R29, observou-se a presença de uma banda extra localizada imediatamente abaixo da HbF no perfil obtido por Focagem Isoelétrica. Todavia, por motivos financeiros, optou-se apenas pela sequenciação do gene HBA2, que não revelou qualquer mutação. Este resultado sugere, então, que a tal banda adicional não se encontra relacionada com variantes da cadeia α codificadas pelo gene HBA2, o que indica a presença de variantes codificadas pelo gene HBA1 ou associadas à cadeia globínica β . Tal como noutros casos já discutidos, a ausência de dados relativos a todos os genes codificantes das cadeias globínicas constitui uma importante limitação.

SEQUÊNCIA	0241:	CCGGGCGTGCCCCGCGCCCAAGCATAAACCTGGCGCGCTCGCGGCCGGCACTCTTC
IDENTIDADE		
SEQUENREF	0241:	-----ACTCTTC
SEQUÊNCIA	0301:	TGGTCCCCACAGACTCAGAGAGAACCACCATGGTGTGTCTCCTGCCGACAAGACCAAC
IDENTIDADE		
SEQUENREF	0301:	TGGTCCCCACAGACTCAGAGAGAACCACCATGGTGTGTCTCCTGCCGACAAGACCAAC
SEQUÊNCIA	0361:	GTC AAGGCCGCTGGGGTAAGGTCGGCGCGCACGCTGGCGAGTATGGTGC GGAGGCCCTG
IDENTIDADE		
SEQUENREF	0361:	GTC AAGGCCGCTGGGGTAAGGTCGGCGCGCACGCTGGCGAGTATGGTGC GGAGGCCCTG
SEQUÊNCIA	0421:	GAGAGGTGAGGCTCCCTCCCTGCTCCGACCCGGGCTCCTCGCCCGCCCGACCCACAGG
IDENTIDADE		
SEQUENREF	0421:	GAGAG-----
SEQUÊNCIA	0541:	AGGATGTTCTGTCTTCCCCACCACCAAGACCTACTTCCCGCACTTCGACCTGAGCCAC
IDENTIDADE		
SEQUENREF	0541:	- GATGTTCTGTCTTCCCCACCACCAAGACCTACTTCCCGCACTTCGACCTGAGCCAC
SEQUÊNCIA	0601:	GGCTCTGCCAGGTTAAGGGCCACGGCAAGAAGGTGGCCGACGCGCTGACCAACGCCGTG
IDENTIDADE		
SEQUENREF	0601:	GGCTCTGCCAGGTTAAGGGCCACGGCAAGAAGGTGGCCGACGCGCTGACCAACGCCGTG
SEQUÊNCIA	0661:	GCGCACGTGGACGACATGCCCAACGCGTGTCCGCCCTGAGCGACTGCACGCGACAAG
IDENTIDADE		
SEQUENREF	0661:	GCGCACGTGGACGACATGCCCAACGCGTGTCCGCCCTGAGCGACTGCACGCGACAAG
SEQUÊNCIA	0721:	CTTCGGGTGGACCCGGTCAACTTCAAGGTGAGCGGGCCGGGAGCGATCTGGGTCGAG
IDENTIDADE		
SEQUENREF	0721:	CTTCGGGTGGACCCGGTCAACTTCAAG-----
SEQUÊNCIA	0781:	GGGCGAGATGGCGCCTTCTCTCAGGGCAGAGGATCACGCGGGTTGCGGGAGGTGTAGCG
IDENTIDADE		
SEQUÊNCIA	0841:	CAGGCGGGCGGCTGCGGGCCTGGGCCGACTGACCCTTCTCTGCACAGCTCCTAAGCCA
IDENTIDADE		
SEQUENREF	0841:	-----CTCCTAAGCCA
SEQUÊNCIA	0901:	CTGCCTGCTGGTGACCCTGGCCGCCACCTCCCCGCCGAGTTCACCCCTGCGGTGCACGC
IDENTIDADE		
SEQUENREF	0901:	CTGCCTGCTGGTGACCCTGGCCGCCACCTCCCCGCCGAGTTCACCCCTGCGGTGCACGC
SEQUÊNCIA	0961:	CTCCCTGGACAAGTTCCTGGCTTCTGTGAGCACCGTGTGACCTCCAAATACCGTTAAGC
IDENTIDADE		
SEQUENREF	0961:	CTCCCTGGACAAGTTCCTGGCTTCTGTGAGCACCGTGTGACCTCCAAATACCGTTAAGC
SEQUÊNCIA	1021:	TGGAGCCTCGGTAGCCGTTCTCCTGCCCCTGGGCCCTCCAACGGGCCCTCTCCCTC
IDENTIDADE		
SEQUENREF	1021:	TGGAGCCTCGGTAGCCGTTCTCCTGCCCCTGGGCCCTCCAACGGGCCCTCTCCCTC
SEQUÊNCIA	1081:	CTTGCACCGGCCCTTCTGGTCTTTGAATAAAGTCTGAGTGGGCGGCAGCCTGTGTGTGC
IDENTIDADE		
SEQUENREF	1081:	CTTGCACCGGCCCTTCTGGTCTTTGAATAAAGTCTGAGT---GGCAGCA-----

Figura 5.29: Alinhamento entre as sequências obtidas por sequenciação (Sequência) e as sequencias de referência (Sequenref) dos 3 exões do gene HBA2. O alinhamento evidencia uma correspondência quase total entre as sequências, exceto por pequenos desalinhamentos na extremidade 3', interpretados como artefactos da leitura. Este resultado foi o obtido para todas as amostras sequenciadas para o gene HBA2.

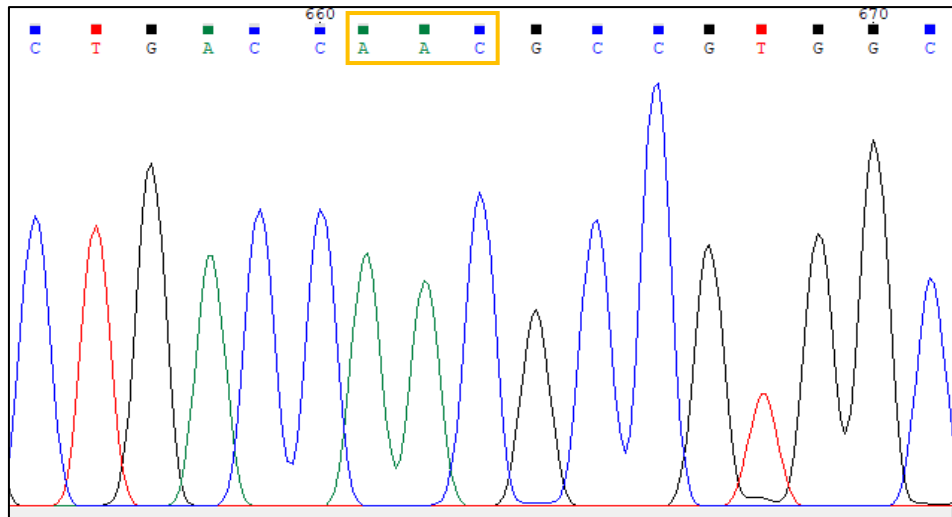


Figura 5.30: Cromatograma da sequenciação do gene HBA2. Observa-se a ausência de mutações. A amarelo encontra-se o codão AAC (Asparagina), que seria afetado na presença da mutação responsável pela HbG^{Ph}, passando a codificar uma Lisina.

5.2.4. PESQUISA DA DELEÇÃO $-\alpha^{3.7kb}$

Dado que a deleção $-\alpha^{3.7kb}$ é de elevada prevalência no continente africano, preconizou-se a sua pesquisa através de Gap-PCR. No entanto, apenas foi possível obter resultados em três das amostras analisadas (R30, R39, R45), o que limita a interpretação dos dados em termos estatísticos.

Esta limitação parece estar associada à qualidade das amostras, dado que o mesmo protocolo, quando aplicado a amostras de sangue total de outros estudos realizados, demonstrou apresentar resultados fiáveis. Dadas as particularidades das amostras de sangue seco em papel de filtro, o protocolo foi adaptado, tendo-se aumentado a quantidade de amostra utilizada, não tendo demonstrando, mesmo assim resultados aceitáveis.

Em todas as três amostras analisadas foi obtido o mesmo resultado: heterozigotia para a deleção $-\alpha^{3.7}$ ($-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$), como se pode verificar na Figura 5.31 através da presença de dois fragmentos de 2182pb e 1900pb ($\alpha 2$) e de um fragmento de 999pb ($\alpha 1$). Este genótipo é descrito na literatura como clinicamente silencioso, não se encontrando associado a manifestações clínicas graves, nomeadamente a anemias críticas, ou à necessidade de tratamento específico [51]. Ainda assim, a sua presença traduz-se geralmente em alterações hematológicas subtis, em particular microcitose e hipocromia, o que por si só não constitui um problema clínico. Contudo, estes achados podem

direcionar para diagnósticos incorretos de anemia ferropénica e, conseqüentemente, levar a terapêuticas desnecessárias com ferro [51], [53]. Por outro lado, apesar de nem sempre acontecer, este genótipo pode traduzir-se em quadros de leve anemia [55].

Além disso, a literatura tem demonstrado que a presença desta deleção, quer seja em heterozigotia ou em homozigotia, pode atuar como um fator modelador de fenótipo em doentes com hemoglobinopatias, como seja a anemia falciforme. Neste contexto, um estudo de 2024 [137] identificou indivíduos simultaneamente portadores de HbS e da deleção $-\alpha^{3.7}$ (em homo e heterozigotia), tendo-se verificado diferenças significativamente estatísticas nos índices hematimétricos Volume Globular Médio e Hemoglobina Globular Média, bem como na contagem de plaquetas. Além disso, verificou-se uma maior prevalência de priapismo nos indivíduos que tinham as duas referidas mutações, o que sugere que a α -talassemia devido à deleção em estudo pode influenciar o curso de outras doenças hematológicas [137].

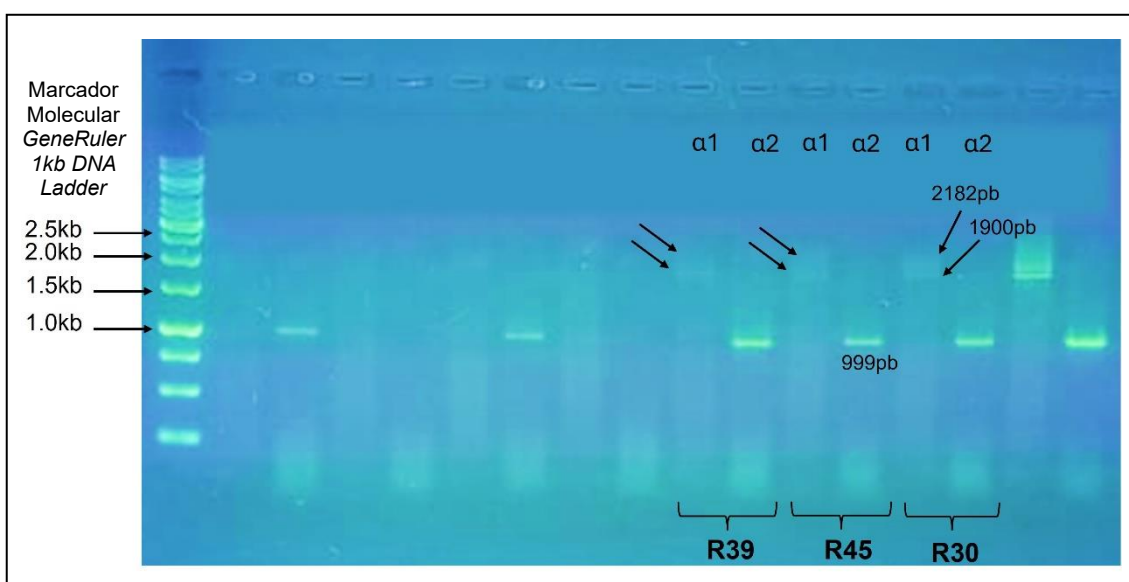


Figura 5.31: Resultados do Gap-PCR para pesquisa da deleção $-\alpha^{3.7kb}$ nas amostras R39, R45 e R30. Observa-se a presença simultânea de fragmentos de 2182, 1900 e 999pb, o que é compatível com a heterozigotia para a deleção ($-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$). As bandas de 2182 e 1900 pb (setas) apresentam-se bastante ténues, sendo de difícil observação nas fotografias captadas.

Finda a discussão dos resultados obtidos através da Focagem Isoelétrica (IEF), PCR-RFLP, sequenciação e Gap-PCR, tem-se que a análise molecular das 45 amostras com perfis eletroforéticos atípicos revelou diversidade de genótipos. O genótipo AS foi confirmado em 12 amostras (26.7%), embora em todos estes casos tenham persistido padrões não totalmente esclarecidos. Uma única amostra (2.2%) demonstrou o genótipo SS, além da presença de uma banda adicional na IEF não identificada. Foram ainda

confirmados oito casos (17.8%) do genótipo AC e um caso (2.2%) do genótipo AE, este último representando uma variante pouco expectável na população estudada e sugerindo possíveis fenómenos de ancestralidade ou migratórios. Porém, em mais de metade das amostras (51.1%) não foi possível esclarecer de forma conclusiva o perfil observado. Nestes casos, diversos fatores, como limitações técnicas, fraca qualidade do DNA extraído das amostras de sangue seco e as dificuldades intrínsecas à amplificação dos genes das cadeias α poderão ter contribuído para os resultados inconclusivos, como já discutido.

6. CONCLUSÃO E PERSPETIVAS FUTURAS

O presente estudo teve como objetivo a caracterização molecular das variantes de hemoglobina identificadas no âmbito de um Programa de Rastreio Neonatal de Anemia das Células Falciformes (ACF) em Angola. A análise de 13 256 amostras por Focagem Isoelétrica (IEF) permitiu identificar amostras com genótipo AA, AS e SS, bem como um subconjunto de 45 amostras com perfis eletroforéticos atípicos, selecionadas para investigação molecular complementar.

A aplicação de técnicas moleculares como o PCR-RFLP, Gap-PCR e a sequenciação de Sanger permitiu confirmar a presença de variantes estruturais como a HbS e a HbC, de elevada de prevalência no continente africano. No entanto, foi possível identificar variantes menos expectáveis, como a HbE, revelando a diversidade genética presente na população estudada.

Foram detetadas hemoglobinas com pontos isoelétricos aparentemente semelhantes à HbS e HbC, não tendo havido confirmação molecular dessas variantes, o que destaca a existência de variantes raras ou artefactos técnicos, além de enaltecer a importância da caracterização genotípica para evitar diagnósticos incorretos.

Além disso, a deteção de SNPs benignos, como o rs10768683 e o rs713040, levanta questões relevantes sobre o seu eventual papel modificador do fenótipo, especialmente quando em associação com outras variantes estruturais. A análise das cadeias alfa revelou-se limitada pela complexidade da amplificação dos genes HBA, constituindo-se como uma das principais limitações técnicas deste estudo.

Os resultados obtidos neste estudo reforçam, assim, a importância da complementaridade entre métodos fenotípicos e moleculares na confirmação diagnóstica das hemoglobinopatias, particularmente em contextos de rastreio neonatal em regiões com elevada diversidade genética, como o continente africano. A

identificação de variantes não esperadas reforça também a necessidade de abordagens diagnósticas mais abrangentes que considerem fenómenos de ancestralidade e migração.

Por questões financeiras e de otimização de recursos, neste estudo não foi desde logo preconizada a sequenciação completa dos genes HBA e HBB em todas as amostras. Ainda assim, com base nas conclusões e limitações deste trabalho, considera-se pertinente, no futuro, garantir a sequenciação completa desses genes em todas as amostras analisadas, uma vez que a interpretação baseada apenas em padrões eletroforéticos não permite determinar com certeza absoluta qual o gene envolvido no padrão atípico observado. Só uma análise integrada e abrangente permite esclarecer a natureza das variantes, evitando interpretações erróneas baseadas apenas na mobilidade eletroforética. Esta abordagem permitiria diminuir drasticamente a percentagem de amostras com resultados não determinados.

Além disso, a implementação de técnicas complementares demonstrar-se-ia igualmente vantajosa, nomeadamente a utilização de Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC) ou Eletroforese Capilar (EC).

Como visto, o impacto de alguns SNPs ainda não se encontra devidamente esclarecido. Assim, a realização de estudos de associação fenótipo-genótipo envolvendo SNPs como o rs10768683 e o rs713040, em associação com variantes estruturais, poderia ser relevante para esclarecer o seu verdadeiro impacto clínico no contexto das hemoglobinopatias.

Importa também salientar que a qualidade dos resultados obtidos se encontra diretamente relacionada com a qualidade das amostras utilizadas. Em comparação com amostras de sangue total, as amostras de sangue seco em papel de filtro apresentam menor qualidade, devido às concentrações de DNA substancialmente inferiores. Assim, recomenda-se que em trabalhos futuros seja priorizada a utilização de amostras de sangue total, de modo a maximizar a fiabilidade dos resultados.

Ainda que neste estudo inúmeros padrões eletroforéticos tenham permanecido por esclarecer, a presença dos mesmos indica que os rastreios neonatais no continente africano, nomeadamente na África Subsaariana, deveriam idealmente alargar o seu foco, passando a abranger as hemoglobinas como um todo e não apenas a Anemia das Células Falciformes (ACF). Relativamente a esses padrões desconhecidos, considera-se essencial que os médicos responsáveis pelo seguimento clínico dos recém-nascidos sejam devidamente notificados, o que permitiria uma vigilância mais próxima através de análises periódicas, prestando-se especial atenção aos níveis de hemoglobina, de forma a avaliar a eventual presença de anemia, bem como aos níveis hematimétricos.

Este acompanhamento possibilitaria a deteção precoce de manifestações clínicas associadas a hemoglobinopatias, ainda que não tenham sido identificadas com precisão na triagem inicial, garantindo uma intervenção médica atempada e adequada.

Para finalizar, este estudo não só contribuiu para o aprofundamento do conhecimento sobre a diversidade das variantes de hemoglobina na população angolana, como também espelhou a necessidade de abordagens diagnósticas mais robustas e abrangentes. A conjugação de metodologias fenotípicas e genotípicas, aliadas a um seguimento clínico atento, revela-se crucial para incrementar a precisão diagnóstica, otimizar estratégias de rastreio neonatal e, acima de tudo, promover uma intervenção precoce e eficaz no contexto das hemoglobinopatias.

7. REFERÊNCIAS

- [1] B. J. Bain, I. Bates, M. A. Laffan, e M. S. Lewis, *Dacie and Lewis Practical Haematology*, 11th ed. Elsevier Churchill Livingstone, 2011.
- [2] E. Junior B. e C. E. B. Domingos, *Diagnóstico laboratorial das hemoglobinopatias*. Brasília: Ministério da Saúde, 2024. [Online]. Disponível em: www.saude.gov.br
- [3] M. H. Ahmed, M. S. Ghatge, e M. K. Safo, «Hemoglobin: Structure, Function and Allostery», em *Subcellular Biochemistry*, vol. 94, Springer, 2020, pp. 345–382. doi: 10.1007/978-3-030-41769-7_14.
- [4] C. L. Hartevelde *et al.*, «The hemoglobinopathies, molecular disease mechanisms and diagnostics», *International Journal of Laboratory Hematology*, vol. 44, n.º S1. John Wiley and Sons Inc, pp. 28–36, setembro de 2022. doi: 10.1111/ijlh.13885.
- [5] E. Kohne, «Hemoglobinopathies: Clinical Manifestations, Diagnosis, and Treatment», *Dtsch. Ärztebl. Int.*, vol. 108, n.º 31–32, p. 532, ago. 2011, doi: 10.3238/ARZTEBL.2011.0532.
- [6] S. Fattoum, «Evolution of hemoglobinopathy prevention in Africa: results, problems and prospect», *Mediterr. J. Hematol. Infect. Dis.*, 2009, doi: 10.4084/mjihid.2009.005.
- [7] F. B. Piel *et al.*, «Defining global strategies to improve outcomes in sickle cell disease: a Lancet Haematology Commission», *The Lancet Haematology*, vol. 10, n.º 8. Elsevier Ltd, pp. e633–e686, agosto de 2023. doi: 10.1016/S2352-3026(23)00096-0.
- [8] N. S. Green *et al.*, «The Consortium on Newborn Screening in Africa for sickle cell disease: study rationale and methodology», *Blood Adv.*, vol. 6, n.º 24, pp. 6187–6197, dez. 2022, doi: 10.1182/bloodadvances.2022007698.
- [9] L. Tshilolo *et al.*, «Neonatal screening for sickle cell anaemia in the Democratic Republic of the Congo: Experience from a pioneer project on 31 204 newborns», *J. Clin. Pathol.*, vol. 62, n.º 1, pp. 35–38, jan. 2009, doi: 10.1136/jcp.2008.058958.
- [10] P. T. McGann *et al.*, «A prospective newborn screening and treatment program for sickle cell anemia in Luanda, Angola», *Am. J. Hematol.*, vol. 88, n.º 12, pp. 984–989, dez. 2013, doi: 10.1002/ajh.23578.
- [11] P. T. McGann *et al.*, «A Cost-Effectiveness Analysis of a Pilot Neonatal Screening Program for Sickle Cell Anemia in the Republic of Angola», *J. Pediatr.*, vol. 167, n.º 6, pp. 1314–1319, dez. 2015, doi: 10.1016/j.jpeds.2015.08.068.
- [12] G. Ndeezi *et al.*, «Burden of sickle cell trait and disease in the Uganda Sickle Surveillance Study (US3): A cross-sectional study», *Lancet Glob. Health*, vol. 4, n.º 3, pp. e195–e200, mar. 2016, doi: 10.1016/S2214-109X(15)00288-0.
- [13] A. J. Marengo-Rowe, «Structure-function relations of human hemoglobins», *Proc. Bayl. Univ. Med. Cent.*, vol. 19, n.º 3, p. 239, jul. 2006, doi: 10.1080/08998280.2006.11928171.
- [14] L. E. Rosenberg e D. D. Rosenberg, «Single-Gene Defects», em *Human Genes and Genomes*, Elsevier, 2012, pp. 169–196. doi: 10.1016/b978-0-12385212-0.00001-9.
- [15] L. Manca e B. Masala, «Disorders of the synthesis of human fetal hemoglobin», *IUBMB Life*, vol. 60, n.º 2, pp. 94–111, 2008, doi: 10.1002/IUB.4.,.

- [16] J. S. Lee, S. I. Cho, S. S. Park, e M. W. Seong, «Molecular basis and diagnosis of thalassemia», *Blood Res.*, vol. 56, pp. 39–43, 2021, doi: 10.5045/br.2021.2020332.
- [17] D. Kumar, Ed., *Genomics and Health in the Developing World*. em Oxford Monographs on Medical Genetics. Oxford, New York: Oxford University Press, 2012.
- [18] J. A. da Luz, M. Sans, E. M. Kimura, D. M. Albuquerque, M. de F. Sonati, e F. F. Costa, «alpha-thalassemia, HbS, and beta-globin gene cluster haplotypes in two Afro-Uruguayan sub-populations from northern and southern Uruguay», *Genet. Mol. Biol.*, vol. 29, n.º 4, pp. 595–600, 2006, doi: 10.1590/S1415-47572006000400002.
- [19] A. Sani *et al.*, «Diagnosis and screening of abnormal hemoglobins», *Clinica Chimica Acta*, vol. 552. Elsevier B.V., janeiro de 2024. doi: 10.1016/j.cca.2023.117685.
- [20] G. Hardouin, E. Magrin, A. Corsia, M. Cavazzana, A. Miccio, e M. Semeraro, «Sickle Cell Disease: From Genetics to Curative Approaches», *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.*, vol. 25, n.º 18, p. 18, 2025, doi: 10.1146/annurev-genom-120122.
- [21] «rs334 RefSNP Report - dbSNP - NCBI». Acedido: 3 de agosto de 2025. [Online]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs334>
- [22] E. Rao, S. K. Chandraker, M. M. Singh, e R. Kumar, «Global distribution of β -thalassemia mutations: An update», *Gene*, vol. 896. Elsevier B.V., fevereiro de 2024. doi: 10.1016/j.gene.2023.148022.
- [23] A. W. Macharia *et al.*, « β -Thalassemia pathogenic variants in a cohort of children from the East African coast», *Mol. Genet. Genomic Med.*, vol. 8, n.º 7, jul. 2020, doi: 10.1002/mgg3.1294.
- [24] K. Koza, J. Fabijańska-Mitek, e A. Łoniewska-Lwowska, «Hemoglobinopathies and thalassemias – genetic basis and molecular diagnosis», *Adv. Med. Sci.*, vol. XXV, n.º 7, 2012.
- [25] D. E. Sabath, «Molecular Diagnosis of Thalassemias and Hemoglobinopathies: An ACLPS Critical Review», *Am. J. Clin. Pathol.*, vol. 148, n.º 1, pp. 6–15, jul. 2017, doi: 10.1093/ajcp/aqx047.
- [26] T. H. Jaing, T. Y. Chang, S. H. Chen, C. W. Lin, Y. C. Wen, e C. C. Chiu, «Molecular genetics of β -thalassemia: A narrative review», *Medicine (Baltimore)*, vol. 100, n.º 45, p. e27522, nov. 2021, doi: 10.1097/MD.00000000000027522.
- [27] V. D. Sanctis *et al.*, « β -thalassemia distribution in the old world: An ancient disease seen from a historical standpoint», *Mediterr. J. Hematol. Infect. Dis.*, vol. 9, n.º 1, 2017, doi: 10.4084/mjhid.2017.018.
- [28] I. Agouti, C. Badens, A. Abouyoub, N. Levy, e M. Bennani, «Molecular Basis of β -Thalassemia in Morocco: Possible Origins of the Molecular Heterogeneity».
- [29] H. A. Hamamy e N. A. S. Al-Allawi, «Epidemiological profile of common haemoglobinopathies in Arab countries», *Journal of Community Genetics*, vol. 4, n.º 2, pp. 147–167, abril de 2013. doi: 10.1007/s12687-012-0127-8.
- [30] B. Chami *et al.*, «Hemoglobin variants in North Africa», *Hemoglobin*, vol. 18, n.º 1, pp. 39–51, jan. 1994, doi: 10.3109/03630269409014144.
- [31] «rs35004220 RefSNP Report - dbSNP - NCBI». Acedido: 3 de agosto de 2025. [Online]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs35004220>
- [32] S. L. Thein, «The molecular basis of β -thalassemia», *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, vol. 3, n.º 5, mai. 2013, doi: 10.1101/cshperspect.a011700.

- [33] E. Borges *et al.*, «Unusual β -Globin Haplotype Distribution in Newborns from Bengo, Angola», *Hemoglobin*, vol. 43, n.º 3, pp. 149–154, mai. 2019, doi: 10.1080/03630269.2019.1647230.
- [34] «rs11549407 RefSNP Report - dbSNP - NCBI». Acedido: 3 de agosto de 2025. [Online]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs11549407>
- [35] «rs33971440 RefSNP Report - dbSNP - NCBI». Acedido: 3 de agosto de 2025. [Online]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs33971440>
- [36] «rs193922563 RefSNP Report - dbSNP - NCBI». Acedido: 3 de agosto de 2025. [Online]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs193922563>
- [37] «rs35724775 RefSNP Report - dbSNP - NCBI». Acedido: 3 de agosto de 2025. [Online]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs35724775>
- [38] «rs34690599 RefSNP Report - dbSNP - NCBI». Acedido: 3 de agosto de 2025. [Online]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs34690599>
- [39] R. Galanello e R. Origa, «Open Access REVIEW BioMed Central Beta-thalassaemia», 2010. [Online]. Disponível em: <http://www.ojrd.com/content/5/1/11>
- [40] «rs63749819 RefSNP Report - dbSNP - NCBI». Acedido: 3 de agosto de 2025. [Online]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs63749819>
- [41] «rs35497102 RefSNP Report - dbSNP - NCBI». Acedido: 3 de agosto de 2025. [Online]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs35497102>
- [42] «rs33959855 RefSNP Report - dbSNP - NCBI». Acedido: 3 de agosto de 2025. [Online]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs33959855>
- [43] «rs33941849 RefSNP Report - dbSNP - NCBI». Acedido: 3 de agosto de 2025. [Online]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs33941849>
- [44] K. M. Musallam *et al.*, «Alpha-thalassaemia - A practical overview», *Blood Rev.*, vol. 64, mar. 2024, doi: doi.org/10.1016/j.blre.2023.101165.
- [45] B. Santos *et al.*, «Co-Inheritance of alpha-thalassaemia and sickle cell disease in a cohort of Angolan pediatric patients», *Mol. Biol. Rep.*, vol. 47, n.º 7, pp. 5397–5402, jul. 2020, doi: 10.1007/s11033-020-05628-8.
- [46] R. Galanello e A. Cao, «Alpha-thalassaemia», *Genetics in Medicine*, vol. 13, n.º 2, pp. 83–88, fevereiro de 2011. doi: 10.1097/GIM.0b013e3181fcb468.
- [47] C. L. Harteveld e D. R. Higgs, « α -thalassaemia», *Orphanet J. Rare Dis.*, vol. 5, n.º 13, 2010, [Online]. Disponível em: <http://www.ojrd.com/content/5/1/13>
- [48] F. P. Mockenhaupt *et al.*, « α +thalassaemia protects African children from severe malaria», *Blood*, vol. 104, n.º 7, pp. 2003–2006, out. 2004, doi: 10.1182/blood-2003-11-4090.
- [49] E. Baysal e T. H. J. Huisman, «Detection of Common Deletional Thalassaemia-2 Determinants by PCR».
- [50] A. T. Taher, D. J. Weatherall, e M. D. Cappellini, «Thalassaemia», *The Lancet*, vol. 391, n.º 10116. Lancet Publishing Group, pp. 155–167, janeiro de 2018. doi: 10.1016/S0140-6736(17)31822-6.
- [51] G. H. de M. Alcoforado *et al.*, «Prevalence of α -thalassaemia 3.7 kb deletion in the adult population of Rio Grande do Norte, Brazil», *Genet. Mol. Biol.*, vol. 35, n.º 3, pp. 594–598, 2012, doi: 10.1590/S1415-47572012005000049.

- [52] «The Most Common Types of 3.7 Kilobase Deletion in the Iranian Population: Hemoglobin: Vol 48, No 6». Acedido: 3 de agosto de 2025. [Online]. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/03630269.2024.2435379>
- [53] T. Charoenwijitkul *et al.*, «Molecular characteristics of α +thalassemia (3.7 kb deletion) in Southeast Asia: Molecular subtypes, haplotypic heterogeneity, multiple founder effects and laboratory diagnostics», *Clin. Biochem.*, vol. 71, pp. 31–37, set. 2019, doi: 10.1016/j.clinbiochem.2019.06.005.
- [54] L. Alderei, N. Alshkeili, D. Alnaqbi, O. A. Shehab, R. Vijayan, e A.-K. Souid, «Premarital Counseling on the Alpha Thalassemia Allele HBA2:c.*94A>G», *Thalass. Rep.*, vol. 14, n.º 2, pp. 44–48, jun. 2024, doi: 10.3390/THALASSREP14020006.
- [55] A. E. S. Souza, G. L. Cardoso, S. Y. L. Takanashi, e J. F. Guerreiro, «Alpha-thalassemia (3.7 kb deletion) in a population from the Brazilian Amazon region: Santarém, Pará State», *Genet. Mol. Res. GMR*, vol. 8, n.º 2, pp. 477–481, abr. 2009, doi: 10.4238/vol8-2gmr601.
- [56] «rs33930165 RefSNP Report - dbSNP - NCBI». Acedido: 3 de agosto de 2025. [Online]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs33930165>
- [57] F. B. Piel *et al.*, «The distribution of haemoglobin C and its prevalence in newborns in Africa», *Sci. Rep. 2013 31*, vol. 3, n.º 1, pp. 1–8, abr. 2013, doi: 10.1038/srep01671.
- [58] E. A. Zaabi, B. Karna, e K. J. Suman, *Hemoglobin C Disease*. StatPearls Publishing LLC. [Online]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK559043/>
- [59] «rs111033601 RefSNP Report - dbSNP - NCBI». Acedido: 3 de agosto de 2025. [Online]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs111033601>
- [60] M. S. M. Khalil, A. Timbs, S. Henderson, A. Schuh, M. R. A. Hussein, e J. Old, «Haemoglobin (Hb) G-Philadelphia, Hb Stanleyville-II, Hb G-Norfolk, Hb Matsue-OKI and Hb Mizushi can form a panel of α -chain variants that overlap in their phenotype: The novel use of Styl to screen for Hb G-Philadelphia», *Int. J. Lab. Hematol.*, vol. 33, n.º 3, pp. 318–325, jun. 2011, doi: 10.1111/j.1751-553X.2010.01289.x.
- [61] Z. Yi-Tao, M. E. Headlee, J. Henson, H. Lam, J. B. Wilson, e T. H. J. Huisman, «Identification of hemoglobin G-Philadelphia (a68 Asn Lys) and hemoglobin Matsue-OKI-OKI (a75 Asp Asn) in a black infant», 1982.
- [62] H. S. Olaniyan, N. Ashraf, e R. L. Konger, «A Rare Case of Homozygous Hemoglobin G-Philadelphia & Alpha Thalassemia», *Am. J. Clin. Pathol.*, vol. 162, n.º Supplement_1, pp. S17–S17, out. 2024, doi: 10.1093/AJCP/AQAE129.037.
- [63] O. A. Alvarez *et al.*, «Implementation of hospital-based sickle cell newborn screening and follow-up programs in Haiti», *Blood Adv.*, vol. 8, n.º 1, pp. 14–22, jan. 2024, doi: 10.1182/bloodadvances.2023010104.
- [64] H. R. Yusuf, M. A. Lloyd-Puryear, A. M. Grant, C. S. Parker, M. S. Creary, e H. K. Atrash, «Sickle cell disease: The need for a public health agenda», *Am. J. Prev. Med.*, vol. 41, n.º 6 SUPPL.4, dez. 2011, doi: 10.1016/j.amepre.2011.09.007.
- [65] N. El-Haj e C. C. Hoppe, «Newborn screening for SCD in the USA and Canada», *International Journal of Neonatal Screening*, vol. 4, n.º 4. MDPI Multidisciplinary Digital Publishing Institute, dezembro de 2018. doi: 10.3390/ijns4040036.
- [66] M. C. Rahimy, «Dkpistage prkcoce et prise en charge mkdicale de la drbpanocytose : cinq annkes d'expkrience & Cotonou», 1999.
- [67] «Bridging the gaps in newborn screening programmes: Challenges and opportunities to detect haemoglobinopathies in Africa | Twum | African Journal of Laboratory

- Medicine». [Online]. Disponível em: <https://ajlmonline.org/index.php/ajlm/article/view/2225/2807>
- [68] K. Ohene-Frempong, J. Oduro, H. Tetteh, e F. Nkrumah, «SCREENING NEWBORNS FOR SICKLE CELL DISEASE IN GHANA», *Pediatrics*, vol. 121, n.º Supplement_2, pp. S120–S121, jan. 2008, doi: 10.1542/peds.2007-2022uuu.
- [69] C. I. Segbefia *et al.*, «Implementing newborn screening for sickle cell disease in Korle Bu Teaching Hospital, Accra: Results and lessons learned», *Pediatr. Blood Cancer*, vol. 68, n.º 7, jul. 2021, doi: 10.1002/pbc.29068.
- [70] E. E. Ambrose *et al.*, «Surveillance for sickle cell disease, united republic of tanzania», *Bull. World Health Organ.*, vol. 98, n.º 12, pp. 859–868, 2020, doi: 10.2471/BLT.20.253583.
- [71] J. Old, *Prevention of thalassaemias and other haemoglobin disorders. Volume 1, Principles*. Thalassaemia International Federation, 2013.
- [72] A. N. Barrett, R. Saminathan, e M. Choolani, «Thalassaemia screening and confirmation of carriers in parents», *Best Practice and Research: Clinical Obstetrics and Gynaecology*, vol. 39. Bailliere Tindall Ltd, pp. 27–40, fevereiro de 2017. doi: 10.1016/j.bpobgyn.2016.10.015.
- [73] Association of Public Health Laboratories, «Hemoglobinopathies: Current Practices for Screening, Confirmation and Follow-up». 2015. [Online]. Disponível em: https://www.cdc.gov/sickle-cell/media/pdfs/nbs_hemoglobinopathy-testing_122015.pdf
- [74] C. Frömmel, «Newborn screening for sickle cell disease and other hemoglobinopathies: A short review on classical laboratory methods — Isoelectric focusing, HPLC, and capillary electrophoresis», *International Journal of Neonatal Screening*, vol. 4, n.º 4. MDPI Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 2018. doi: 10.3390/ijns4040039.
- [75] J. M. R. Bélanger, J. R. J. Paré, e M. Sigouin, «High performance liquid chromatography (HPLC): Principles and applications», em *Techniques and Instrumentation in Analytical Chemistry*, vol. 18, n.º C, Elsevier, 1997, pp. 37–59. doi: 10.1016/S0167-9244(97)80011-X.
- [76] B. J. Bain, *Haemoglobinopathy Diagnosis*, Second Edition. Blackwell Publishing, 2006.
- [77] L. M. S. D. Melo, F. A. M. Siqueira, A. C. F. Conte, e C. R. B. Domingos, «Rastreamento de hemoglobinas variantes e talassemias com associação de métodos de diagnóstico», *Rev. Bras. Hematol. E Hemoter.*, vol. 30, n.º 1, pp. 12–17, jan. 2008, doi: 10.1590/S1516-84842008000100006.
- [78] J. G. R. D. JESUS, C. K. A. de C. de Souza, e V. de L. S. Jeraldo, «UTILIZAÇÃO DE CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA PARA O DIAGNÓSTICO LABORATORIAL», *Cad. Grad. - Ciênc. Biológicas E Saúde - UNIT - SERGIPE*, vol. 7, n.º 2, pp. 11–11, abr. 2022, doi: 10.17564/2316-3151.
- [79] «What is HPLC (High Performance Liquid Chromatography) ?». Acedido: 4 de agosto de 2025. [Online]. Disponível em: https://www.ssi.shimadzu.com/service-support/technical-support/analysis-basics/basic/what_is_hplc.html
- [80] J. Old, C. L. Harteveld, J. Traeger-Synodinos, M. Petrou, M. Angastiniotis, e R. Galanello, «Haemoglobin Pattern Analysis», em *Prevention of Thalassaemias and Other Haemoglobin Disorders: Volume 2: Laboratory Protocols [Internet]. 2nd*

- edition, Thalassaemia International Federation, 2012. Acedido: 4 de agosto de 2025. [Online]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK190579/>
- [81] E. M. Keohane, «25 - Thalassemias», em *Rodak's Hematology (Sixth Edition)*, E. M. Keohane, C. N. Otto, e J. M. Walenga, Eds., St. Louis (MO): Elsevier, 2020, pp. 424–444. doi: 10.1016/B978-0-323-53045-3.00034-9.
- [82] T. R. Randolph, «24 - Hemoglobinopathies (structural defects in hemoglobin)», em *Rodak's Hematology (Sixth Edition)*, E. M. Keohane, C. N. Otto, e J. M. Walenga, Eds., St. Louis (MO): Elsevier, 2020, pp. 394–423. doi: 10.1016/B978-0-323-53045-3.00033-7.
- [83] T. C. Lorenz, «Polymerase Chain Reaction: Basic Protocol Plus Troubleshooting and Optimization Strategies», *J. Vis. Exp. JoVE*, n.º 63, p. 3998, mai. 2012, doi: 10.3791/3998.
- [84] M. R. Green e J. Sambrook, «Polymerase chain reaction», *Cold Spring Harb. Protoc.*, vol. 2019, n.º 6, pp. 436–456, jun. 2019, doi: 10.1101/pdb.top095109.
- [85] L. Garibyan e N. Avashia, «Polymerase chain reaction», *J. Invest. Dermatol.*, vol. 133, n.º 3, pp. 1–4, 2013, doi: 10.1038/jid.2013.1.
- [86] L.-Y. Chuang, Y.-H. Cheng, e C.-H. Wen, «Restriction enzyme mining for SNPs in genomes», 2014. [Online]. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?rs=17886268
- [87] L. Bernardino, «Cadernos CISA. A doença das células falciformes. Diagnóstico e tratamento em Angola», vol. n.º 6. março de 2019. [Online]. Disponível em: <https://cisacaxito.org/contents/bibliotecaitens/15929878744417.pdf>
- [88] C. L. Hartevelde, «State of the art and new developments in molecular diagnostics for hemoglobinopathies in multiethnic societies», *International Journal of Laboratory Hematology*, vol. 36, n.º 1. Blackwell Publishing Ltd, pp. 1–12, 2014. doi: 10.1111/ijlh.12108.
- [89] T. Bilgen, Ö. A. Clark, Z. Öztürk, M. A. Yeşilipek, e İ. Keser, «β-Globin gen kümesini içine alan büyük delesyonel mutasyonların Gap-PCR ile taranması türk tipi inversiyon/delesyon (δβ)0 mutasyonunun antalya'da yüksek sıklıkta olduğunu gösterdi», *Turk. J. Hematol.*, vol. 33, n.º 2, pp. 107–111, 2016, doi: 10.4274/tjh.2014.0242.
- [90] G. A. Hawkins, «Analysis of Human Genetic Variations Using DNA Sequencing», em *Basic Science Methods for Clinical Researchers*, Y. L. S. F e M. Jalali, Eds., Academic Press, 2017, pp. 77–98.
- [91] D. Vijian, W. S. W. A. Rahman, K. T. Ponnuraj, Z. Zulkafli, e N. H. M. Noor, «Molecular detection of alpha thalassemia: A review of prevalent techniques», *Medeni. Med. J.*, vol. 36, n.º 3, pp. 257–269, 2021, doi: 10.5222/MMJ.2021.14603.
- [92] C. S. Thom, C. F. Dickson, D. A. Gell, e M. J. Weiss, «Hemoglobin variants: Biochemical properties and clinical correlates», *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, vol. 3, n.º 3, mar. 2013, doi: 10.1101/cshperspect.a011858.
- [93] «Sanger Sequencing Steps & Method». Acedido: 4 de agosto de 2025. [Online]. Disponível em: https://www.sigmaaldrich.com/PT/en/technical-documents/protocol/genomics/sequencing/sanger-sequencing?srsId=AfmBOoq8vmmeytOqZllunSv7kLeWyt5-m0_j8tvVv9U3EEenX5rF9ZzQB
- [94] C. Dodé, K. Raagopal, J. Lamb, e J. Rochette, «Rapid analysis of -α3.7 thalassaemia and αα anti 3.7 triplication by enzymatic amplification analysis», abr. 1992.

- [95] A. S. dos S. Lopes, «Genetic basis of congenital Erythrocytosis: search for new mutations and associated genes and update of online databases», masterThesis, Universidade de Aveiro, 2017. Acedido: 3 de agosto de 2025. [Online]. Disponível em: <https://ria.ua.pt/handle/10773/22704>
- [96] «Biopython · Biopython». [Online]. Disponível em: <https://biopython.org/>
- [97] S. Petti *et al.*, «End-to-end learning of multiple sequence alignments with differentiable Smith–Waterman», *Bioinformatics*, vol. 39, n.º 1, p. btac724, jan. 2023, doi: 10.1093/bioinformatics/btac724.
- [98] A. Khajeh-Saeed, S. Poole, e J. Blair Perot, «Acceleration of the Smith–Waterman algorithm using single and multiple graphics processors», *J. Comput. Phys.*, vol. 229, n.º 11, pp. 4247–4258, jun. 2010, doi: 10.1016/j.jcp.2010.02.009.
- [99] «Home | Sebia | PT», Sebia. Acedido: 25 de setembro de 2025. [Online]. Disponível em: <https://www.sebia.com/pt-pt/>
- [100] S. H. Merchant, J. L. Oliveira, J. D. Hoyer, e D. S. Viswanatha, «Molecular Diagnosis in Hematopathology», em *Hematopathology: A Volume in the Series: Foundations in Diagnostic Pathology*, Second., E. D. Hisi, Ed., W.B. Saunders, 2012, pp. 679–726. doi: 10.1016/B978-1-4377-2606-0.00024-X.
- [101] D. J. Weatherall e J. B. Clegg, *The Thalassaemia Syndromes*, 4th ed. Wiley Blackwell, 2008. doi: 10.1002/9780470696705.
- [102] D. Bachir e F. Galacteros, «Hemoglobin C», [Online]. Disponível em: <http://www.orpha.net/data/patho/GB/uk-HbC.pdf>
- [103] W. K. Ghunney *et al.*, «Most adults with severe HbSC disease are not treated with hydroxyurea», *Blood Adv.*, vol. 7, n.º 13, p. 3312, jul. 2023, doi: 10.1182/BLOODADVANCES.2022009049.
- [104] C. Segbefia e L. Luchtman-Jones, «Seeing haemoglobin SC: Challenging the misperceptions», *Br. J. Haematol.*, vol. 205, n.º 2, pp. 404–405, ago. 2024, doi: 10.1111/BJH.19580.
- [105] D. Rucknagel e J. A. Rising, «A Heterozygote for Hb β S, Hb β C and Hb α GPhiladelphia in a Family Presenting Evidence for Heterogeneity of Hemoglobin Alpha Chain Loci», *Am. J. Med.*, vol. 59, n.º 1, pp. 53–60, 1975.
- [106] D. R. Higgs, M. A. Vickers, A. O. M. Wilkie, I. M. Pretorius, A. P. Jarman, e D. J. Weatherall, «A Review of the Molecular Genetics of the Human α -Globin Gene Cluster», *Blood*, vol. 73, n.º 5, pp. 1081–1104, abr. 1989, doi: 10.1182/BLOOD.V73.5.1081.1081.
- [107] M. R. Silva, «Estudo de hemoglobinopatias variantes com mobilidade eletroforética semelhante à da hemoglobina S em crianças do programa de triagem neonatal de minas gerais (PTN-MG)», PhD Thesis, Universidade Federal de Minas Gerais, 2012.
- [108] R. S. Mashon, R. Das, R. Dhawan, N. Kakkar, e T. Dhar, «Hb Rush (HBB: c.304G>C): A Rare Variant Hemoglobin Mimicking the Hb S (HBB: c.20A>T) Variant on High Performance Liquid Chromatography», *Hemoglobin*, vol. 44, n.º 1, pp. 64–66, jan. 2020, doi: 10.1080/03630269.2020.1733009.
- [109] B. Giardina, M. Brunori, E. Antonini, e L. Tentori, «Properties of hemoglobin G. Ferrara (β 57(E1) Asn \rightarrow Lys)», *Biochim. Biophys. Acta BBA - Protein Struct.*, vol. 534, n.º 1, pp. 1–6, mai. 1978, doi: 10.1016/0005-2795(78)90469-5.
- [110] A. Cao e R. Galanello, «Beta-thalassaemia», *Genet. Med.* 2010 122, vol. 12, n.º 2, pp. 61–76, jan. 2010, doi: 10.1097/gim.0b013e3181cd68ed.

- [111] «rs10768683 (SNP) - Population genetics - Homo_sapiens - Ensembl genome browser 114». [Online]. Disponível em: https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Population?db=core;g=ENSG0000244734;r=11:5225464-5229395;source=dbSNP;t=ENST00000335295;v=rs10768683;vdb=variation;vf=706701333
- [112] «rs10768683 RefSNP Report - dbSNP - NCBI». [Online]. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs10768683#frequency_tab
- [113] S. Uçucu, T. Karabıyık, e F. Azik, «Difficulties in the diagnosis of HbS/beta thalassemia: Really a mild disease?», *J. Med. Biochem.*, vol. 41, n.º 1, p. 32, 2022, doi: 10.5937/JOMB0-30420.
- [114] «rs33950507 RefSNP Report - dbSNP - NCBI». [Online]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs33950507#flanks>
- [115] A. Wahed e A. Dasgupta, «Chapter 4 - Hemoglobinopathies and Thalassemias», em *Hematology and Coagulation*, A. Wahed e A. Dasgupta, Eds., San Diego: Elsevier, 2015, pp. 55–80. doi: 10.1016/B978-0-12-800241-4.00004-8.
- [116] Y. Domínguez, C. Zurita, D. Calvopiña, J. Villacís, e M. Mora, «Prevalence of common hemoglobin variants in an afro-descendent Ecuadorian population», *BMC Res. Notes*, vol. 6, n.º 1, pp. 1–6, abr. 2013, doi: 10.1186/1756-0500-6-132/FIGURES/2.
- [117] S. Fucharoen e D. J. Weatherall, «The hemoglobin E thalassemias», *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, vol. 2, n.º 8, p. a011734, ago. 2012, doi: 10.1101/cshperspect.a011734.
- [118] S. Fucharoen e P. Winichagoon, «Haemoglobinopathies in Southeast Asia», *Indian J. Med. Res.*, vol. 134, n.º 4, pp. 498–506, out. 2011.
- [119] L. Felicetti, A. Novelletto, A. Benincasa, L. Terrenato, e B. Colombo, «The HbA/HbA2 ratio in newborns and its correlation with fetal maturity», *Br. J. Haematol.*, vol. 56, n.º 3, pp. 465–471, 1984, doi: 10.1111/J.1365-2141.1984.TB03976.X.
- [120] J. F. Borgio *et al.*, «The -α37 deletion in α-globin genes increases the concentration of fetal hemoglobin and hemoglobin A2 in a Saudi Arabian population», *Mol. Med. Rep.*, vol. 17, n.º 1, pp. 1879–1884, jan. 2018, doi: 10.3892/mmr.2017.8033.
- [121] «rs34598529 RefSNP Report - dbSNP - NCBI». Acedido: 3 de agosto de 2025. [Online]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs34598529>
- [122] O. A. Babalola *et al.*, «The genetic architecture of the β-globin chain in individuals with and without sickle cell disease in Nigeria: A case for beta thalassemia?», doi: 10.1101/2024.12.20.24319473.
- [123] Y. Hu *et al.*, «Whole genome sequencing association analysis of quantitative red blood cell phenotypes: the NHLBI TOPMed program», *medRxiv*, vol. 46, p. 2020.12.09.20246736, jan. 2021, doi: 10.1101/2020.12.09.20246736.
- [124] D. Gasperini *et al.*, «Normal individuals with high Hb A2 levels», *Br. J. Haematol.*, vol. 84, n.º 1, pp. 166–168, 1993, doi: 10.1111/J.1365-2141.1993.TB03042.X.
- [125] «VCV000036329.65 - ClinVar - NCBI». Acedido: 6 de agosto de 2025. [Online]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/36329/>
- [126] «UCSC In-Silico PCR». Acedido: 14 de outubro de 2025. [Online]. Disponível em: <https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr>

- [127] «rs72561473 RefSNP Report - dbSNP - NCBI». [Online]. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs72561473#seq_hash
- [128] J. S. Wayne, B. Eng, M. Hanna, B. A. Hohenadel, L. N. Nakamura, e L. Walker, «Non-thalassemic phenotype associated with the-83 (G>A) mutation of the β -globin gene promoter (HBB: C.-133G>A)», *Hemoglobin*, vol. 38, n.º 6, pp. 447–448, dez. 2014, doi: 10.3109/03630269.2014.976417.
- [129] Z. Barati, M. Farsimadan, A. Sharafshah, M. Peymani, e M. Bijanzadeh, «Association study of rs10768683 and rs968857 polymorphisms with transfusion-dependent thalassemia (TDT) in a southern Iranian population», *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, vol. 38, n.º 1, pp. 88–99, jan. 2019, doi: 10.1080/15257770.2018.1498514.
- [130] M. Motovali-Bashi, Z. Sajadpoor, e S. Hajihoseini, «Investigation of BamHI and Avall polymorphisms at beta globin cluster gene and its association with beta thalassemia disease in Esfahan population», *Res. Med.*, vol. 38, n.º 4, pp. 226–232, jan. 2015.
- [131] «rs713040 RefSNP Report - dbSNP - NCBI». Acedido: 5 de agosto de 2025. [Online]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs713040>
- [132] L. Liu *et al.*, «[Genotype of thalassemia genes and the polymorphism of β - globin gene in Cantonese]», *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi Zhonghua Xueyexue Zazhi*, vol. 34, n.º 7, pp. 595–599, jul. 2013, doi: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2013.07.008.
- [133] «rs713040 (SNP) - Explore this variant - Homo_sapiens - Ensembl genome browser 114». Acedido: 5 de agosto de 2025. [Online]. Disponível em: https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Explore?r=11:5226513-5227513;v=rs713040;vdb=variation;vf=706467058
- [134] W. Chauhan, R. Fatma, Z. Zaka-ur-Rab, e M. Afzal, «Direct sequencing of β -globin gene reveals a rare combination of two exonic and two intronic variants in a β -thalassemia major patient: a case report», *J. Med. Case Reports*, vol. 16, n.º 1, pp. 1–5, dez. 2022, doi: 10.1186/S13256-022-03605-2/TABLES/1.
- [135] G. Hashmi, A. Qidwai, K. Fernandez, e M. Seul, «Enabling routine β -thalassemia Prevention and Patient Management by scalable, combined Thalassemia and Hemochromatosis Mutation Analysis», *BMC Med. Genet.*, vol. 21, n.º 1, p. 108, mai. 2020, doi: 10.1186/S12881-020-01017-X/FIGURES/3.
- [136] N. M. Rashid e A. A. Sultan, «Assessing the impact of HBB gene polymorphisms on the risk of beta thalassemia in the population of Diyala Governorate, Iraq», *Iraq Med. J.*, vol. 8, n.º 2, jun. 2024, doi: 10.22317/imj.v8i2.1284.
- [137] R. Leal *et al.*, «3.7 Kb deletion of Alpha-Thalassemia significantly associated for priapism in sickle cell anemia patients from Manaus-Am», *Hematol. Transfus. Cell Ther.*, vol. 46, p. S86, out. 2024, doi: 10.1016/j.htct.2024.09.144.

8. APÊNDICES

Apêndice I: Identificação da sequência deletada na presença da deleção -α3.7 kb

Encontra-se, abaixo, uma representação da sequência fasta dos genes HBA2 e HBA1, com identificação da zona deletada na presença da deleção -α3.7 kb (NC_000016.10:g.173384_177187del):

```
catgagcagggatgaccccactggcactcctgcacctcccaccctccccctcgccaagtccaccccctcctcctcacc  
cacatccccctcacctacattctgcaaccacagggccttctccccctgtcctttccctaccagagccaagttgttatctgt  
ttacaaccagtatttacctagcaagtctccatcagatagcatttgagagctgggggtgtcacagtgaaccacgacctta  
ggccagtgggagagtacgtcacacaaactgtgagtcacatgactggggcttagccagcaccaccaccccacgcgcc  
accccacaaccccggttagaggagtctgaatctggagccgccccagcccagccccgtcttttgctcctggtgtttgt  
tcctcccggtgctgtcactcaagcacactagtactatgccagagggaaagggagctgcaggaagcgaggctgga  
gagcaggaggggctctgagcagaaattctttgagttcctatgggccagggcgtccgggtgagcgtcctcctccgcccc  
aggattggcgaaagccctccggctgcactcgtcgcggctgtgtccccgatcccgtggagtcgatgcgctccagcg  
cgtgccaggccggggcgggggtgagggctgactttctccctcgttagggacgtccggcgccccgaaaggaaaggggtg  
gagcgtcgtcctgggggtgacgagccgacagcgcggccgaccccaacggggccggccccgcccagcgccgctaccgcc  
tgcccccgggcgagcgggatggggcgggagtgagtgccgggtggaggggtggagacgtcctggcccccgccccgct  
gcacccccaggggagggccgagcccgcggccccggccccgcgagggccccgcccgggactcccctcgtgctccaggc  
cgcgccccgggctccgcgcccagccaatgagcgcggccccggcgggctgccccgcgccccaaagcataaacctg  
gagcgtcgcggggccggcACTCTTCTGGTCCCCACAGACTCAGAGAGAACCCACCATGG  
TGCTGTCTCCTGCCGACAAGACCAACGTCAAGGCCGCCTGGGGTAAGGTCGGC  
GCGCACGCTGGCGAGTATGGTGC GGAGGCCCTGGAGAGgtgaggtcctcctcccctgct  
ccgacccgggctcctcgcggccccggacccacaggccaccctcaaccgtcctggccccggacccaaacc  
cacccctcactctgttctccccgcagGATGTTCTGTCTTCCCCACCAAGACCTACT  
TCCCGCACTTCGACCTGAGCCACGGCTCTGCCAGGTTAAGGGCCACGGCAAG  
AAGGTGGCCGACGCGCTGACCAACGCCGTGGCGCACGTGGACGACATGCCCA  
ACGCGCTGTCCGCCCTGAGCGACCTGCACGCGCACAAGCTTCGGGTGGACCCG  
GTCAACTTCAAGgtgagcggcgggccccgggagcgatctgggtcgaggggagatggcgccttctc  
tcagggcagaggatcacgcggggtgagggaggtgtagcgcagggcggcggctgagggcctggggcgcact  
gaccctcttctctgcacagCTCCTAAGCCACTGCCTGCTGGTGACCCTGGCCGCCACC  
TCCCCGCCGAGTTCACCCCTGCGGTGCACGCCTCCCTGGACAAGTTCCTGGCTT  
CTGTGAGCACCGTGTGACCTCCAATAACGTTAAGCTGGAGCCTCGGTAGCCG  
TTCCTCCTGCCCGCTGGGCCTCCCAACGGGCCCTCCTCCCCTCCTTGCACCGGC  
CCTTCTGGTCTTTGAATAAAGTCTGAGTGGGCAGCAgcctgtgtgctggttctctatcc  
cggaatgtccaacaatggaggttttacctgtctcagaccaaggacctctcgcagctgcatgggctggggagggag  
aactgcagggagatgggaggggaagctgaggtgggctgtcaagagaaggtgctgaaccatccccgtctctgaga  
ggtgccaggcctgcagggcagtggtcagaagctggggagggagagggcatccagggttctactcagggagctccag  
catgccaccctccttgaatcctcctggtgaaccagttaacatacgtctccatcaaaacaaaacgaaacaaaaca  
aactagcaaaataggctgtcccagtgcaagtgcaggtgccagaacatttctcattcccacccttctgcccaggggt  
agggtgctggagtgaggggtgctggcctactcacactcctgtgtcacgggtgacctctgagagcagcccagtcagtg  
gaaggaggaaggggctgggatgtcacagccggcagcccacacctggggagactcttcagcagagcaccttgcggc  
cttactcctgcacgtctcctgcagtttgaaggtgacattcagaactcactgtgtgccagccctgagctcccagctaattgc  
ccaccagggcctctgggacctcctggtcttctgtctcctgtgctgccagcaactctggaaacgtccctgtccccgggtg  
aagtcctggaatccatgctgggaagttgcacagcccactctggtctcagccagcctaggaacatgagcagcacttcaa  
cccagtcctgccccacagcaagcctccccctccacactcacagtaactgagcttggggaggggtggagaggac  
cctgtcactgcttctctgtgacatggacctcttgaattgtgggagttccctcccctctccaccaccgctcttctgcg  
tcacagcccagagcattgttattcagcagaaacacttataaaataaactaaaatccgacaggcaggggtgctcacgc  
ctgtaatcccagcactttgggagggcggaggtgggaggtacactgaggtcgggagttgagaccacctgatcaacatg  
tagaaacccatctataactaaaatacaaaatcagccgggcatggtggccatgcctgtaaaccacactcctcgggag  
gctgagggcaggagaatcatttaaccaaggaggcagaggtgacgtgagctaaatcacaccattgcactccagcctg
```

gaaaacaacagcgaaactccgcctcaaaaaaaaaaagccccacatcttcttttttctcctcaggctgtgggcag
agtcagaagaggggtggcagacagggaggggaaatgagaagatccaacgggggaagcattgctaagctggcggag
ctacttcttctctgcccaggcagcttaccctggctgtcctggacaccaggcagggcctgagtaagggcctgggg
agacagggcagggagcaggtgaaggggtgtgacctgatgacctcctcaaagcaagatcttctgcccagacccccagg
aaatgactatcagtgatttctcaggctgtttctcctcagttaccctcccccaaaaaacatcacttttcatgcacagggatgc
accactggcactcctgcacctcccaccctccccagaagtccacccttctcctcaccctgcaggagctggccagcct
catcaccacaacatctcccacctcattctccaaccacagggccttctcctctgtccttccccctccccgagccaagc
ctctccctcctccacctcctccacctaatacatatccttaagtctcacctcctccaggaagcctcagactaacctggc
ccttgaatgcctcgtccacacctccagacttctcagggcctgtgatgaggtctgcacctctgtgtactgtgtgatggta
gaggactgcctacctccagaggaggtgaaatgctccagccggtccagctattgctttttacctgttaaccagttattac
ctagcaagtctccatcagatagcatttggagagctgggggtgtcacagtgaaccacgacctctaggccagtgaggagag
tcagtacacaaactgtgagtccatgacttggggcttagccagcaccaccaccacgcgccacccccacaaccccg
ggtagaggagtctgaatctggagccgccccagcccagccccgtcttttgcgtcctgggtttattccttcccggctcctgt
cactcaagcactagtgactatcgccagagggaaagggagctgcaggaagcgaggctggagagcaggagggggct
ctgcgagaaattctttgagttcctatggggcagggcgtccgggtgctgcgcattcctcctccgccccaggattggggcgaag
cctcccggctcgcactcgtcgtcggcctggtccccgatcccgtggagctgatgctgcgtccagcgcgtgcccagggcgg
ggcgggggtgctgggctgactttctcctcgttagggacgtccggcgcggcggaaaggaaaggggtggcgtcgtcctccg
gggtgcacgagccgacagcggccgaccccaacgggcccggccccgcccagcgcgctaccgccccccccggggcg
agcgggatgggggggagtgagtggggggtggaggggtggagacgtcctggccccgccccgctgcacccccagg
ggaggccgagcccggccccggccccgagggccccgccccggactcccctgctggtccaggccgccccggg
ctccgcccagccaatgagcggccccggcggcgtgccccgcccccaagcataaacctggcgcgtcgcgg
cccggc**ACTCTTCTGGTCCCCACAGACTCAGAGAGAACCCACCATGGTGCTGTCTC**
CTGCCGACAAGACCAACGTCAAGGCCGCTGGGGTAAGGTCGGCGCGCACGCT
GGCGAGTATGGTGCAGGAGGCCCTGGAGAGGgtgaggctcccctcccctgctccgaccgggct
cctcggcccgggaccacagggccaccctcaaccgtcctggccccggaccacaacccccaccctcactct
gcttctccccgag**GATGTTCTGTCCTTCCCCACCAAGACCTACTTCCCGCACT**
TCGACCTGAGCCACGGCTCTGCCAGGTTAAGGGCCACGGCAAGAAGGTGGCC
GACGCGCTGACCAACGCCGTGGCGCACGTGGACGACATGCCAACGCGCTGTC
CGCCCTGAGCGACCTGCACGCGCACAAAGCTTCGGGTGGACCCGGTCAACTTCA
AGgtgagcggcgggcccgggagcgtctgggtcaggggagatggcgccttctcgcagggcagagg
atcacgcgggtgctgggaggtgtagcgcagggcggcgtcgggctgggcccctcggccccactgacct
cttctctg
cacag**CTCCTAAGCCACTGCCTGCTGGTGACCCTGGCCGCCACCTCCCCGCCG**
AGTTCACCCCTGCGGTGCACGCTCCCTGGACAAGTTCCTGGCTTCTGTGAGCA
CCGTGCTGACCTCAAATACCGTTAAGCTGGAGCCTCGGTGGCCATGCTTCTTG
CCCCTTGGGCCTCCCCCAGCCCTCCTCCCTTCTGCACCCGTACCCCGTG
GTCTTTGAATAAAGTCTGAGTGGCGGCAgctgtgtgtgctgagttttccctcagcaaacg
tgccagcatgggctggacagcagctgggacacacatggctagaacctctgcagctggatagggtagg
aaaaggcaggggc

Legenda:

- **Exões (letras maiúsculas) e intrões (letras minúsculas) do gene HBA2**
- **Exões (letras maiúsculas) e intrões (letras minúsculas) do gene HBA1**
- Sequência deletada

Apêndice II: Protocolo da Focagem Isoelétrica de hemoglobinas no equipamento Migele com o o kit comercial RESOLVE™ *Hemoglobin kit Assay*

1. Ligar o equipamento.
2. Limpar a unidade de eletroforese com um papel húmido e secar com um papel seco.
3. Com o furador metálico, cortar um disco de papel com 6 mm de diâmetro por amostra.
4. Colocar cada disco num poço de uma placa de fundo liso.
5. Adicionar 25 µL de *Hb Elution Solution* a cada poço.
6. Cobrir a placa e agitar durante 10 minutos.
7. Deixar repousar 30 minutos para eluição completa da hemoglobina.
8. Retirar o gel do invólucro, respeitando a orientação inscrita "This side up".
9. Remover e descartar a película protetora.
10. Dispensar 3 µL de amostra e controlos em cada poço (usar uma pipeta multicanal para facilitar a pipetagem das amostras).
11. Colocar o gel na workstation.
12. Limpar suavemente a superfície do gel com papel, aguardar 10 segundos e remover o papel.
13. Posicionar o sample *Application template* sobre o gel, pressionando levemente com os dedos.
14. Embeber uma tira de papel de filtro, fornecida no kit, em *Cathode Solution* e posicionar na área indicada, passando suavemente o dedo para garantir uma boa adesão da tira ao gel.
15. Aplicar a *Anode Solution*.
16. Embeber duas tiras de papel de filtro em *Anode Solution* e aplicar, tal como no ponto 14.
17. Colocar o gel no equipamento, abrindo a tampa e a gaveta do mesmo.
18. Pipetar 4 µL de água destilada no centro da unidade, garantindo a ausência de bolhas entre o gel e a superfície do equipamento.
19. Colocar o gel centrado.
20. Remover o excesso de água em volta do gel com papel.
21. Programar a fonte de alimentação: 30 Watts, 1200 Volts, 100 miliamperes, durante 110 minutos.
22. Submergir o gel em solução de TCA 10%, durante 10 minutos sob agitação.

- 23.** Lavar o gel com água destilada (duas lavagens de 10 minutos)
- 24.** Preparar a solução de coloração (20 ml de JB Stain Buffer + 36 mL de *JB-2 Gel Stain Concentrate* + 144 mL de água destilada + 4 mL de *JB-2 Stain Activator*, nesta ordem).
- 25.** Submergir o gel numa tina de coloração com a solução preparada durante 7 minutos.
- 26.** Remover o corante
- 27.** Submergir o gel e água destilada durante 60 minutos, trocando a água no mínimo 4 vezes.

Apêndice III: Protocolo detalhado da extração de DNA das amostras de sangue seco, usando o kit QIamp DNA mini

1. Com um furador de 3mm cortar 3 discos de uma mancha seca de sangue.
2. Colocar os discos num tubo de microcentrifuga de 1.5 mL.
3. Adicionar 180 μ L de *Buffer ATL* ao tubo.
4. Incubar a 85°C durante 10 minutos.
5. Centrifugar brevemente para eliminar gotas da tampa do tubo.
6. Adicionar 20 μ L de solução de Proteinase K.
7. Vortexar bem.
8. Incubar a 56°C durante 1 hora.
9. Centrifugar brevemente para eliminar gotas da tampa do tubo.
10. Adicionar 200 μ L de *Buffer AL* e vortexar.
11. Centrifugar brevemente para eliminar gotas da tampa do tubo.
12. Adicionar 200 μ L de etanol (96-100%) e vortexar.
13. Centrifugar brevemente para eliminar gotas da tampa do tubo.
14. Transferir toda a mistura para uma QIAamp Mini spin column colocada num tubo de 2 mL.
15. Fechar a tampa e centrifugar a 8000 rpm durante 1 minuto.
16. Descartar o tubo com o filtrado. Transferir a coluna para um novo tubo de 2 mL.
17. Fazer uma lavagem, adicionando Buffer AW1 à coluna.
18. Centrifugar a 8000 rpm durante 1 minuto.
19. Descartar o tubo com o filtrado e transferir a coluna para um novo tubo de 2 mL.
20. Fazer outra lavagem, adicionando 500 μ L de Buffer AW2.
21. Centrifugar a 14 000 rpm durante 3 minutos.
22. Transferir a coluna para um novo tubo de 2 mL.
23. Centrifugar a 14 000 rpm durante 1 minuto.
24. Transferir a coluna para um tubo de microcentrifuga de 1.5 mL limpo.
25. Adicionar 150 μ L de Buffer AE e incubar a temperatura ambiente durante 1 minuto.
26. Centrifugar a 8000 rpm por minuto para eluir o DNA.

Apêndice IV: Fragmento do gene HBB amplificado pelo PCR-RFLP para pesquisa do SNP rs334 (previamente à digestão enzimática)

chr11:5226791-5227180 (390bp)

ACCTCACCTGTGGAGCCACaccctaggggtggccaatctactcccaggagcagggagggcaggagcc
agggctgggcataaaagtcagggcagagccatctattgctacattgctctgacacaactgtgtcactagcaacctcaa
acagacaccatggtgcatctgactcctgAggagaagtctgccgtactgccctgtggggcaaggtgaacgtggatgaag
ttggtggtgaggcctgggcaggttggtatcaaggttacaagacaggttaaggagaccaatagaaactgggcatgtgg
agacagagaagactctgggttctgataggcactgactctctctgcctattggtcTATTTTCCCACCCTTAGGC
TGCTGGT

Legenda:

- Exão 1
- **SNP rs334 (HBB: c.20A>T)**
- *Primers*

Apêndice V: Fragmentos originados através do PCR-RFLP (após a digestão com a enzima *Bsu36I*)

Alelo *Wild type* (SNP rs334 ausente):

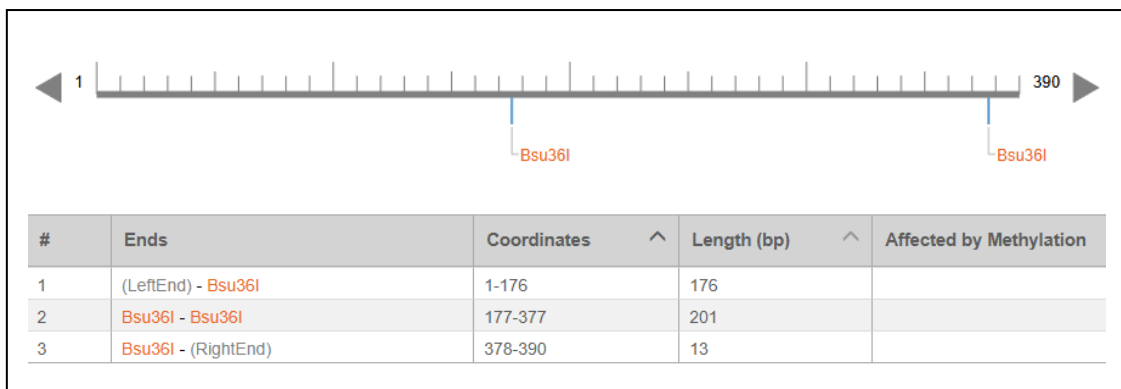


Figura A1: Representação dos locais de ligação da enzima *Bsu36I* e fragmentos resultantes da digestão no alelo *Wild type*. Fonte: NEBcutter

Alelo mutado (SNP rs334 presente):

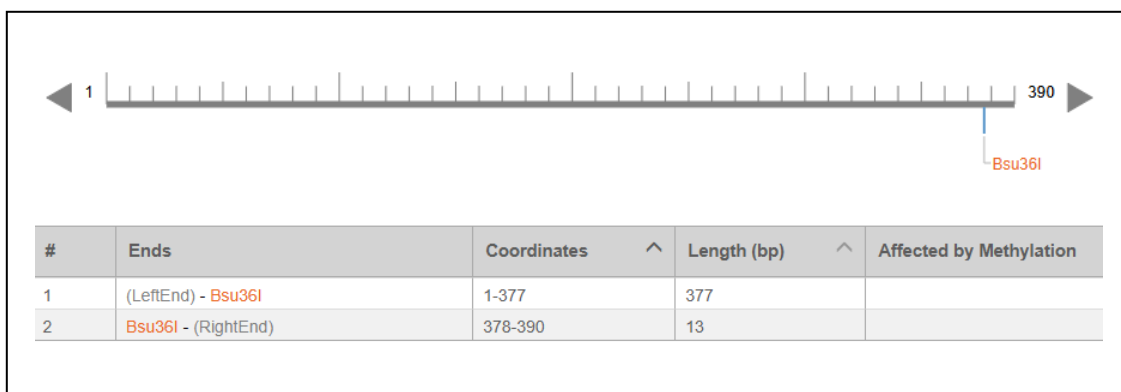


Figura A2: Representação dos locais de ligação da enzima *Bsu36I* e fragmentos resultantes da digestão no alelo mutado. Fonte: NEBcutter

Apêndice VI: Fragmento do gene HBA2 amplificado pelos *primers* A e B usados no GAP-PCR para pesquisa da deleção - $\alpha^{3.7}$ (na ausência da deleção)

chr16:172762+173760 (999pb):

GGACTCCCCTGCGGTCCAGGccgcgccccgggctccgcgccagccaatgagcgccgccggccggggc
 gtgccccgcgccccaaagcataaacctggcgcgctcgcgggccggcactcttctgttccccacagactcagagaga
 acccaccatggtgctgtctctcgcgacaagaccaacgtaaggccgctgggtaaggctggcgcgcacgctggcg
 agtatggtgcgaggccctggagaggtgaggctccctcccctgctccgacccgggctcctcgcccggccgaccaca
 ggccaccctcaaccgtcctgccccggaccxaaacccaccctcactctgcttccccgcaggatgttctgtccttcc
 ccaccaccaagacacttcccgcacttcgacctgagccacggctctgccaggtaaggggccacggcaagaagggtg
 gccgacgcgctgaccaacgccgtggcgcacgtggacgacatgccaacgcgctgtccgcctgagcgacctgcacg
 cgcacaagctcgggtggaccggtaactcaagggtgagcggcggggcgggagcgatctgggtcgagggggcgaga
 tggcgcttctctcagggcagaggatcacgcgggttgcgggaggtgtagcgcaggcggcggtgcgggcctggggcc
 gcactgaccttctctcgcacagctcctaagccactgctgctggtgacctggccgccacctccccgccgagttcacc
 cctgcggtgcacgcctccctggacaagttcctggcttctgtgagcaccgtgctgacctcaaataccgtaagctggagcc
 tcggtagccgttctcctgcccgtgggctcccaacgggacctcctcccctcctgacccggcccttctgttcttgaata
 aagtctgagtgggcagcagcctgtgtgtgctgggttctctatCCCGGAATGTGCCAACAATGGAG

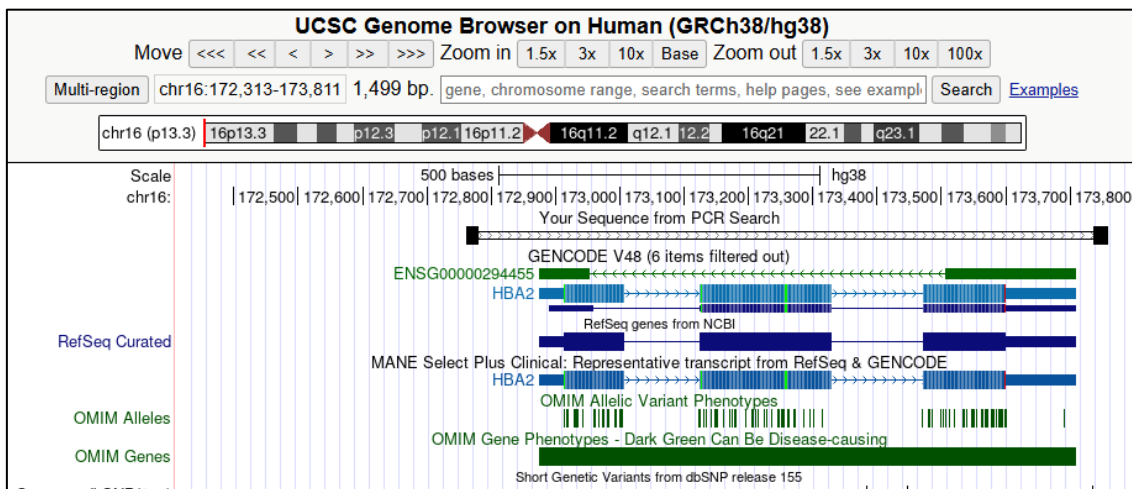


Figura A3: Localização genómica da região amplificada por PCR com os primers A e B no cromossoma 16, visualizada através do *UCSC Genome Browser*.

Legenda:

- Locais de ligação dos *primers* A (5' GGACTCCCCTGCGGTCCAGG 3') e B (5' CTCCATTGTTGGCACATTCCGGG 3')

Apêndice VII: Fragmento do gene HBA2 amplificado pelos primers A' e C usados no GAP-PCR para pesquisa da deleção - $\alpha^{3.7}$ (na ausência da deleção)

chr16:175402+177583 (2182 pb)

GGGATGCACCCACTGGCACTcctgcacctcccaccctcccagaagtcacccccttcttctcaccctgc
aggagctggccagcctcatcaccacaacatctcccacctccattctccaaccacagggccctgtctctctgtcctttcc
cctccccgagccaagcctctcctcctccacctcctccacctaatacatatccttaagtctcacctcctccaggaagccct
cagactaacctggtcacctgaaatgcctcgtccacacctccagacttctcagggcctgtgatgaggtctgcacctctgtg
tgtactgtgtgatggttagaggactgcctacctcccagaggaggtgaaatgctccagccggtccagctattgctttgtttacc
tgtttaaccagtatcttagcaagtcttccatcagatagcatttgagagctgggggtgtcacagtgaaccacgacctt
aggccagtgaggagagtcagtcacacaaactgtgagtcattgagggcttagccagcaccaccacccccacgagc
caccacacaacccccgggtagaggagctgaaatctggagccgccccagcccagccccgtcttttgctcctggtgttta
ttcctcccgggtgcctgtcactcaagcacactagtgactatgccagagggaaagggagctgcaggaagcgaggctgg
agagcaggagggctctgcgcagaaattctttgagttcctatgggccagggcgtccgggtgcgcgattcctctccgcc
ccaggattggcggaagcctcccggctcgcactcgtcgcgccgtgttccccgatcccgtggagtcgatgcgcgtccag
cgctgccaggccggggcgggggtgcgggctgactttctcctcgtctagggacgctccggcgcgccgaaaggaaagg
gtggcgctgcgctccgggtgcacgagccgacagcgcgccgaccccaacgggcccggccccgcagcgcgctaccg
ccctgccccgggagcgggatggcgggagtgagtgagggggggaggggtggagacgctcctggcccccgcccc
gctgcacccccagggagccgagcccggccccggccccgcgagggccccgggactcccctgctggtcca
ggccgcgccccgggctccgcgcccagccaatgagcgcgccggccccggcggtgccccgcgccccaaagcataaacc
ctggcgctcgcggccccggcactcttctggtcccacagactcagagagaaccacccatggtgctgtctctcgtccgac
aagaccaacgtcaaggccgctggggtaaggtcggcgcgacgctggcgagtatggtgaggagggcctggagaggt
gaggctcccctcctgctccgacccgggctcctcgcgccggacccacaggccaccctcaaccgtcctggccccgg
accacaacccccaccctcactctgcttccccgcaggatgttctgtccttccccaccaccaagacctactcccgcactt
cgacctgagccacggctctgcccaggtaaggccacggcaagaaggtggccgacgctgaccaacgcccgtggcg
cacgtggacgacatgccaacgcgctgtccgccctgagcgcacctgcacgcgcacaagcttcgggtggaccgggtcaa
ctcaaggtgagcggcgggcccgggagcgtctgggtcagggggcagatggcgccttctcgcagggcagaggatc
acgcggggtgcgggaggtgtagcgcagggcgccgctgcgggctggccctcgccccactgacctcttctctgcac
agctcctaagccactgctgctggtgacctggccgcccacctccccgagttcaccctgcgggtgcacgctcctctg
gacaagttcctggcttctgtgagaccgtgctgacctcaaataaccgtaagctggagcctcggtggccatgcttctgccc
ctgggctccccccagccccctcctcccctctgcacccgtacccccgtggtctttgaataaagtctgagtgggcggcagc
ctgtgtgcctgagttttccctcagcaaacgtgcccaGGCATGGGCGTGGACAGCAG

Legenda:

- Locais de ligação dos *primers* A' (5' GGGATGCACCCACTGGCACT 3') e C (5' CTGCTGTCCACGCCCATGCC 3')

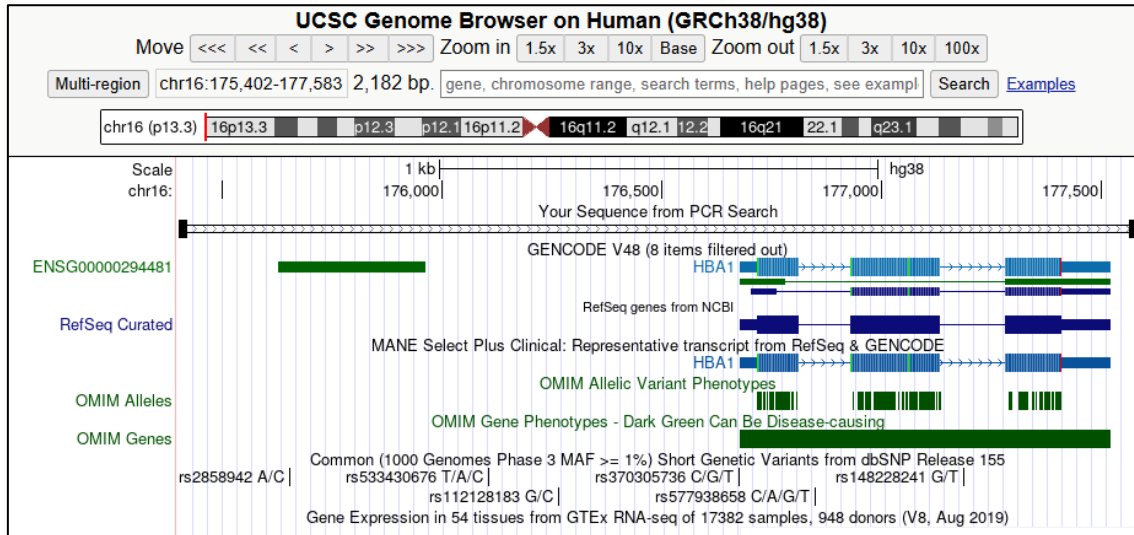


Figura A4: Localização genómica da região amplificada por PCR com os primers A' e C no cromossoma 16, visualizada através do *UCSC Genome Browser*.

Apêndice VIII: Sequência resultante da deleção - α 3.7 kb e identificação dos locais de ligação dos *primers* A' e C usados no GAP-PCR

(Aproximadamente 1900 pb)

catgagcaGGGATGCACCCACTGGCACTcctgcacctcccaccctccccctcgccaagtccacccttctct
tctcaccacacatcccctcacctacattctgcaaccacagggccttctctcccctgtcctttccctaccagagccaagtt
tgtttatctgtttacaaccagtatttacctagcaagctcttccatcagatagcatttgagagctgggggtgtcacagtgaacca
cgacctctaggccagtgaggagtcagtcacacaaactgtgagtcacatgactggggcttagccagcaccaccacc
cacgcgccaccccacaaccccggttagaggagtctgaatctggagccgccccagcccagcccgtgcttttgcgtc
ctggtgtttgtcctcccgtgctgtcactcaagcactagtgactatcgccagagggaaagggagctgcaggaagc
gaggctggagagcaggagggctctgctcagaaattctttgagttcctatgggcccagggcgtccgggtgctgctc
ctctccgccccaggattggggaagccctccggctgcactcgtcgtcggcgtgttccccgatcccgtggagtcgatg
cgctccagcgcgtgccaggccggggcgggggtgctgggctgactttctccctcgttagggacgctccggcgccccgaa
aggaaaggggtggcgtgctcgggggtgcacgagccgacagcgcggccgaccccaacgggcccggccccgcccagc
ccgctaccgcccctgccccggcgagcgggatgggcccggagtgagtgccgggtggaggggtggagacgtcctggcc
ccccgccccgctgcacccccaggggagggccgagcccggccccggccccgctcagggccccgcccgggactcccct
gcggtccaggccgccccgggctccgctccagccaatgagcggccccggccgggctgccccgcccccaag
cataaacctggcgcgtcgcgggcccggcactcttctggtccccacagactcagagagaaccaccatggtgct
gtctcctgccgacaagaccaacgtcaaggccgctggggtaaggctggcgcgacgctggcgagtatggtg
cggaggccctggagaggtgaggctcccctcccctgctccgacccgggctcctcggccccggaccacagggccac
cctcaaccgtcctgccccggaccacaaccccacccctcactctgcttctcccgcaggatgttctgtccttcccac
caccaagactacttcccgcacttcgacctgagccacggctctgcccaggftaagggccacggcaagaaggt
ggccgacgcgctgaccaacgccgtggcgacgtggacgacatgccaacgcgctgtccgccctgagcgcac
ctgcacgcgcacaagcttcgggtggaccgggtcaactcaaggtgagcggcgggcccgggagcgatctgggtgc
aggggcgagatggcgccttctccacagctcctaagccactgctgctggtgacctggccgcccacctcccg
ccgagttaccctcgtcgggtgcacgcctccctggacaagttcctggttctgtgagcaccgtgctgacctcaaa
taccgttaagctggagcctcgggtggccatgcttcttggcccttgggctccccagcccctcctcccctcctg
caccgtacccccgtggtctttgaataaagtctgagtgggcggaacctgtgtgctgagttttccctcagcaaa
cgtgccaGGCATGGGCGTGGACAGCAGctgggacacacatggctagaacctctcagctggataggg
taggaaaaggcaggggcccgggagggggatggaggagggaaagtggagccaccgcaagtccagctggaaaaa

Legenda:

- Exão 1 do gene HBA2
- Exão 2 do gene HBA2
- Exão 3 do gene HBA1
- Locais de ligação dos *primers* A' (5' GGGATGCACCCACTGGCACT 3') e C (5' CTGCTGTCCACGCCCATGCC 3')

Apêndice IX: Fragmento resultante da amplificação dos exões 1 e 2 do gene HBB

chr11:5226505-5227131 (627bp)

AGCAGGGAGGGCAGGAGCCAGgggctgggcataaaagtcagggcagagccatctattgcttacattgctt
 ctgacacaactgtgtcactagcaacctcaaacagacacccatggtgcatctgactcctgaggagaagtctgccgttactg
 ccctgtggggcaagggtgaacgtggatgaagttggtggtgaggccctgggcaggttggtatcaaggtacaagacaggtt
 aaggagaccaatagaaactgggcatgtggagacagagaagactctgggttctgataggcactgactctctgcctatt
 ggtctatttcccacccttaggctgctggtggtctaccctggaccagaggttctttagtcttggggatctgtccactcctg
 atgctgttatgggcaaccctaagggtgaaggctcatggcaagaaagtctcgggtccttagttagtggtcctgacctg
 acaacctcaagggcaccttggccacactgagtgagctgactgtgacaagctgcacgtggatcctgagaactcaggtg
 gactctatgggacgctgatgttttcttccccttctttctatGGTTAAGTTCATGTCATAGGAAGGGG

Legenda:

- Exão 1
- Exão 2
- Primers Forward (5' AGCAGGGAGGGCAGGAGCCAG 3')
 e Reverse (5' CCCCTTCCTATGACATGAACTTAACC 3')

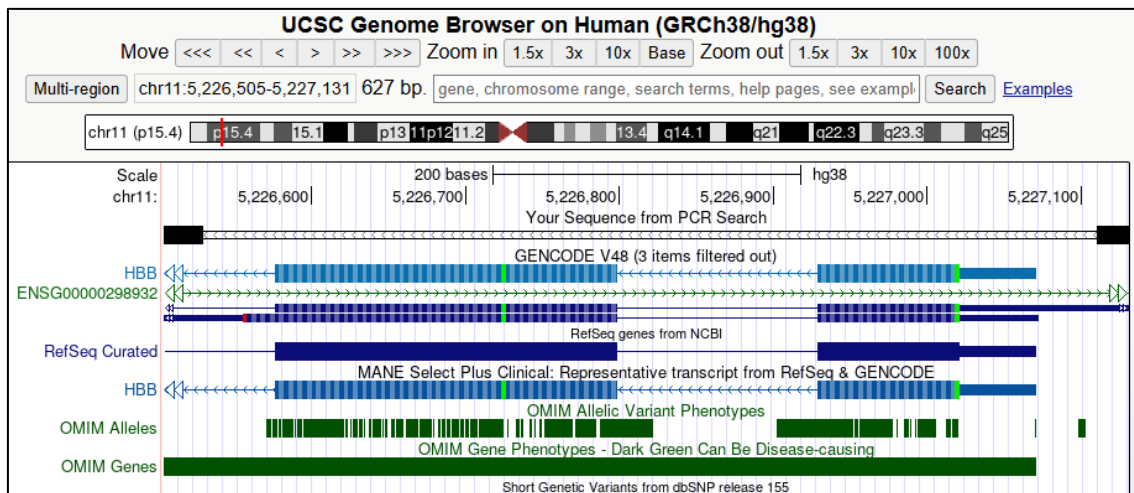


Figura A5: Localização genómica da sequência amplificada por PCR dos exões 1 e 2 do gene HBA no cromossoma 11, visualizada no *UCSC Genome Browser*.

Apêndice X: Fragmento resultante da amplificação do exão 3 do gene HBB

Chr11:5225309-5225976 (668 pb)

```
CATGCCTCTTTGCACCATTCTaaagaataacagtgataatttctgggtaaggcaatagcaatatctctgcat  
ataaatatttctgcatataaattgtaactgatgtaagaggttcatattgctaatagcagctacaatccagctaccattctgctttt  
atztatggttgggataaggctggattattctgagccaagctaggcccttttgctaatacatgttcatacctcttatcttctcccac  
agctcctgggcaacgtgctgggtctgtgtgctggccatcactttggcaaagaattcaccaccagtgaggctgcctatc  
agaaagtggtggctgggtggttaatgccctggccacaagtatcactaagctcgctttctgtgtccaatttctattaag  
gttctttgtccctaagtccaactactaaactgggggatattatgaaggccttgagcatctggattctgcctaataaaaaa  
cattatttctgcaatgatgtattaaattttctgaatattttactaaaaagggatgtgggaggtcagtcatttaaaaca  
taaagaaatgaagagctagttcaaactgggaaaatacactatatcttaactcctgaaagaagGTGAGGCTG  
CAAACAGCTAA
```

Legenda:

- Exão 3
- Primers Forward (5' CATGCCTCTTTGCACCATTCT 3')
e Reverse (5' TTAGCTGTTTGCAGCCTCAC 3')

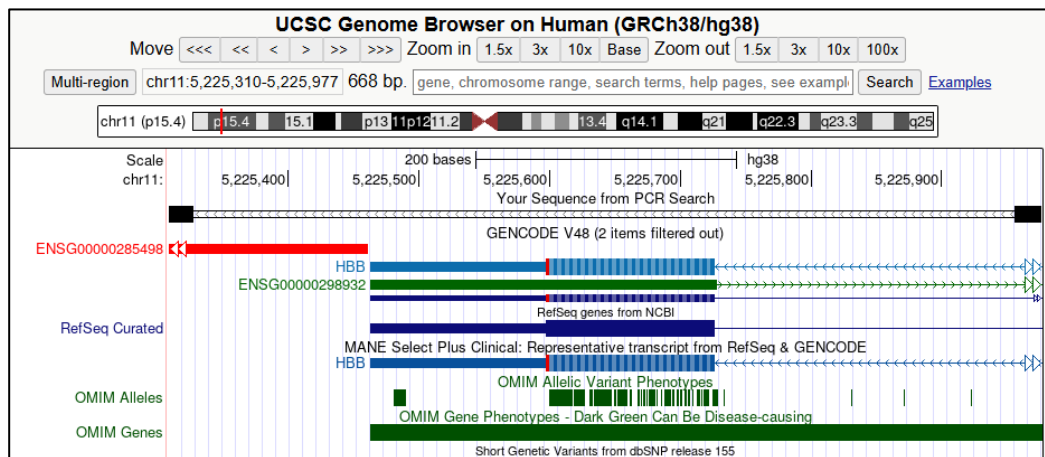


Figura A6: Localização genômica da sequência amplificada por PCR do exão 3 gene HBB no cromossoma 11, visualizada no *UCSC Genome Browser*.

Apêndice XI: Fragmentos resultantes da amplificação dos genes HBA1 e HBA2

Gene HBA1: chr16:176376+177689 (1314 pb)

GGTGCACGAGCCGACAGCGCccgaccccaacgggcccggccccgccagcgccgctaccgccctgcccc
cgggagcgagcgggatgggaggagtgagtgagggtggagagcgtctgcccccgccccgctgcacc
cccaggggaggccgagcccggccccggccccgcgagggccccgggactcccctgcggtccaggccgcg
cccgggctccgcccagccaatgagcggccccggccccggcggtgcccccgcccccaagcataaacctggcg
ctcggccccggcactcttctgtccccacagactcagagagaaccacatggtgctgtctctgcccgacaagaccaa
cgtcaaggccgctgggtaaggtcggcgcgacgctggcgagtatggtgaggaggccctggagaggtgaggctccc
tcccctgctccgaccgggctcctgccccggaccacagggccaccctcaaccgtctgccccggacccaaac
cccaccctcactgtcttccccgaggatgttctgtccttccccaccaccaagacacttcccgcacttcgacctgag
ccacggctctgcccaggtaagggccacggcaagaaggtggccgacgctgaccaacgcccgtggcgacgtggac
gacatgccaacgctgtccgacctgagcgacctgcacgcgacacaagctcgggtggaccggtaactcaaggtg
agcggcgggcccgggagcgatctgggtcaggggagatggcgcttctcgcagggcagaggatcacgagggtg
cgggaggtgtagcagggcggtgccccgctggccctcggccccactgaccttctctgcacagctcctaagc
cactgctgctggtgacctggcccccacctccccggagttaccctcgggtgcagcctcctggacaagtctct
ggcttctgtgagcaccgtgctgacctccaaataccgtaagctggagcctcgggtggccatgcttctgcccctgggctcc
cccagcccctcctcccctcctgacccgtacccccgtgttgaataaagtctgagtgggcggcagcctgtgtgtg
cctgagttttccctcagcaaacgtgccaggcatggcggtggacagcagctgggacacacatggctagaac
ctctctgcagctggatagggtaggaaaaggcaggggcccggaggaggggatggaggagggaaagtggA
GCCACCGCGAAGTCCAG

Legenda:

- Exão 1
- Exão 2
- Exão 3
- *Primers*

Gene HBA2: chr16:172572+173909 (1338 pb)

GGTGCACGAGCCGACAGCGCccgaccccaacgggcccggccccccgacgcccgtaccgcccgtcccc
cgggcgagcgggatgggcccgggagtgagtgggcggtggagggtggagacgtctctgccccgccccgctgcacc
cccaggggagggcagcccggcccggccccgcgacggccccgcccgggactcccctgcggtccaggccgcg
cccgggctccgcccagccaatgagcggcccggccgggcccgtgcccccgcccccaagcataaacctggcgcg
ctcgcgggcccggcactcttctgtccccacagactcagagagaaccacatggtgtctctctgcccacaagaccaa
cgtcaaggccgctggggaaggtcggcgcgacgctggcgagatggtgaggaggccctggagaggtgaggctccc
tcccctgctccgaccgggctcctcggcccggaccacaggccaccctcaaccgtctgccccggacccaaac
cccaccctcactctgttctccccgaggatgttctgtccttccccaccaccaagacacttcccgcacttcgacctgag
ccacggctctgccaggtaagggccacggcaagaaggtggccgacgctgaccaacgccgtggcgacgtggac
gacatgccaacgcgctgtccgcctgagcgacctgcacgcccacaagctcgggtgacccgggtcaactcaaggtg
agcggcgggcccgggagcgatctgggtcagggggcagatggcgcttctctcagggcagaggatcacgagggtgc
gggaggtgtagcagggcggcgtcgggcctgggcccactgaccttctctgcacagctcctaagccactgcct
gctgtgacacctggcccacctccccggcaggtcacccctcgggtgcacgctcctggacaagttcctggcttctgt
gagcaccgtgtgacctcaaataccgtaagctggagcctcggtagccgttctctctgcccgtggcctcccaacggg
ccctctcccctcctgaccggcccttctggtctttgaataaagctgagtggcagcagcctgtgtgtcctgggttctct
tatcccggaatgtccaacaatggaggtgttacctgtctcagaccaaggacctctcagctgcatgggctggggag
ggagaactgcagggagatgggaggggaagctgaggtggcctgctcaagagaaggtgctgaacatcccctgtcC
TGAGAGGTGCCAGGCCTGC

Legenda:

- Exão 1
- Exão 2
- Exão 3
- Primers

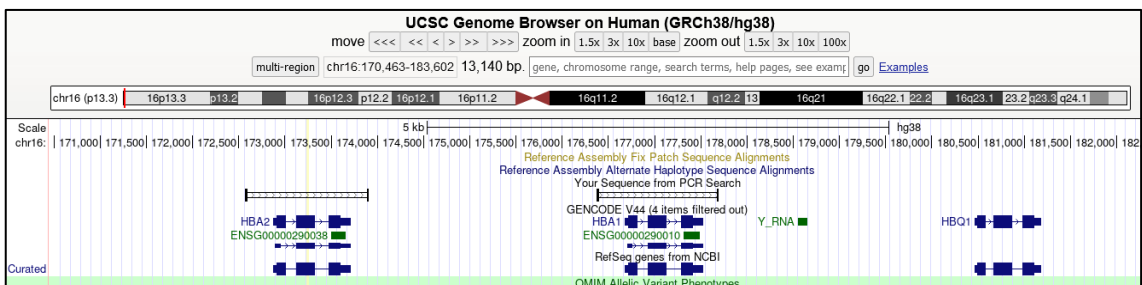


Figura A7: Localização genómica das sequências amplificadas por PCR dos genes HBA1 e HBA2 no cromossoma 16, visualizadas no *UCSC Genome Browser*.

9. ANEXOS

**Anexo I: Parecer favorável do Comité Nacional de Ética de Angola (nº21
C.E/MINSA.INIS/2023)**



REPÚBLICA DE ANGOLA
MINISTÉRIO DA SAÚDE
COMITÉ DE ÉTICA
(CEMS)

PARECER N.º 21 C.E/MINSA.INIS/2023

Sobre o projecto de pesquisa intitulado "RASTREIO NEONATAL E DESENVOLVIMENTO DE COORTE DE CRIANÇAS COM ANEMIA DAS CÉLULAS FALCIFORMES, NO HOSPITAL MATERNO INFANTIL DR. MANUEL AZANCOT DE MENEZES, ANGOLA", submetido a este Comité pelo investigador MIGUEL BRITO.

Após apreciação do protocolo do projecto de investigação supracitado, somos a tecer o seguinte parecer:

- Estando acatados os princípios fundamentais éticos, observando-se a conformidade na elaboração do respectivo projecto, este Comité não se opõe à sua realização e considera-o relevante.

Decisão: Este Comité é de parecer **FAVÓRAVEL** à realização do referido estudo.

LUANDA, AOS 13 DE JUNHO DE 2023.

A COORDENADORA

JOANA DE MORAIS, PHD.



Rua Amílcar Cabral Nº. 96, à frente do Banco de Urgências do Hospital Josina Machel, Maianga – Luanda, Angola. **Telefone:** +244 924 390 307 **e-mail:** comitedeetica@inis.gov.ao e comitedeetica91@gmail.com

Anexo II: Parecer favorável da Comissão de Ética da Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa

CE-ESTeSL-Nº. 28-2023 – Miguel Brito



De Comissão Ética <conselhodeetica@estesl.ipl.pt>
Para Miguel Brito <miguel.brito@estesl.ipl.pt>
Data 19-05-2023 20:47



REFERÊNCIA INTERNA DO PROJETO: CE-ESTeSL-Nº. 28-2023 – Miguel Brito

TÍTULO DO PROJETO: Rastreio Neonatal e desenvolvimento de coorte de crianças com Anemia das Células Falciformes, no Hospital Materno Infantil Dr Manuel Pedro Azancot de Menezes, Angola

Tipo de Projeto/Estudo: Investigação

Investigador/a Responsável: Prof. Doutor Miguel Brito

EQUIPA: Jocelyne Vasconcelos, Investigadora, Centro de Investigação em Saúde de Angola, Investigadora Principal em Angola; Brígida Santos, Investigadora, Médica Pediatra, Centro de Investigação em Saúde de Angola (CISA) / Instituto Nacional de Investigação em Saúde (INIS); Manuela Mendes, Médica, Diretora do hospital, Hospital Materno Infantil Dr Manuel Pedro Azancot de Menezes (Camama); Miguel Brito, Investigador, Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa, Instituto Politécnico de Lisboa (Centro de Investigação em Saúde e Tecnologia, H&TRC); Catarina Ginete, Investigador, Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa, Instituto Politécnico de Lisboa (Centro de Investigação em Saúde e Tecnologia, H&TRC)
Baba Inusa, Consultor do projeto, Médico Pediatra Doutorado, King's College London, UK.

INSTITUIÇÃO PROMOTORA: Escola Superior de Tecnologia da Saúde do Instituto Politécnico de Lisboa

Instituição(ões) envolvidas: ESTeSL - IPL; H&TRC; Centro de Investigação em Saúde de Angola (CISA) / Instituto Nacional de Investigação em Saúde (INIS); Hospital Materno Infantil Dr Manuel Pedro Azancot de Menezes (Camama)

SUBMISSÃO do PROJETO: 11 maio 2023

Exmo. Senhor Prof. Doutor Miguel Brito

A Comissão de Ética da Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa (CE-ESTeSL) considera que pela análise do conteúdo da proposta apresentada, a investigação em causa tem pertinência, é clara nos seus objetivos, explicita nas suas opções metodológicas e no essencial dos procedimentos relativos à recolha dos dados. A CE-ESTeSL aprovou por unanimidade a emissão de parecer favorável com o pedido de remeter à CE-ESTeSL o parecer da comissão de ética nacional pertencente ao ministério da saúde de Angola.

O presente parecer tem em consideração a versão submetida do projeto e demais documentação enviada. Eventuais alterações nestes documentos determinam a necessidade de revisão do presente parecer.

Lembramos que todos os estudos que envolvem a autorização dos participantes e a recolha de amostras e dados anonimizados e/ou codificados têm de cumprir com o estabelecido no Regulamento Geral sobre a Proteção de Dados de 27 de abril de 2016.

Por último, solicita-se que, ao abrigo do artº 19 da Lei 21/2014 de 16 de abril e do disposto no nº 23 da atual versão da Declaração de Helsínquia, seja dado conhecimento à CE-ESTeSL do relatório final, com as conclusões do estudo, bem como de eventuais alterações ao protocolo de investigação e demais informações tidas por relevantes.

Aproveitamos ainda para desejar o maior sucesso no desenvolvimento deste trabalho.

Com os melhores cumprimentos,

Rute Borrego

Rute Borrego | Professora Adjunta
Presidente da Comissão de Ética

Av. D. João II, lote 4.69.01- Parque das Nações
1990-096 Lisboa | Portugal
conselhodeetica@estesl.ipl.pt
+351 218980488 (ext. 674)



Anexo III: Consentimento Informado disponibilizado aos representantes legais dos recém-nascidos



Rastreo Neonatal e desenvolvimento de coorte de crianças com Anemia das Células Falciformes"



Consentimento informado

Estamos a fazer um rastreo da anemia das células falciformes em crianças nascidas no Hospital Materno Infantil Dr Manuel Pedro Azancot de Menezes. Este trabalho vai permitir identificar se o seu filho é homozigótico para a doença, utilizando a eletroforese de proteínas por focagem isoelétrica que será realizada em Lisboa, na Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa. Caso a eletroforese indique um fenótipo SS, será realizado uma confirmação do genótipo por PCR-RFLP. Se se confirmar que o seu filho tem anemia das células falciformes (homozigótico SS), será contactado para ser seguido de forma gratuita na consulta de pediatria da drepanocitose no Hospital Materno Infantil Dr Manuel Pedro Azancot de Menezes. Esta consulta será de três em três meses até aos 2 anos de idade e depois semestrais até aos 5 anos de idade. Assim poderemos acompanhar o seu filho de forma a minimizar o impacto da doença.

Para entrar no rastreo neonatal, deverá autorizar, assinando este documento, que se efetue uma picada no calcanhar do seu filho recém-nascido, e se recolha uma amostra de sangue para papel de filtro. Esta colheita somente causará um pequeno desconforto no seu bebé, não provocando nenhum dano. Depois, caso o seu filho seja homozigótico para o alelo S (anemia das células falciformes), será contactada e deverá comparecer às consultas de seguimento da drepanocitose (conforme marcação feita pela equipa de saúde). A participação neste estudo é de carácter voluntário e os riscos físicos, psicológicos ou sociais associados a essa participação são considerados mínimos. Tem o direito de recusar, em qualquer altura do projeto, sem ter nenhuma consequência.

As amostras colhidas no âmbito deste projeto não podem ser utilizadas em atividades com fins lucrativos, pelo que não existe qualquer contrapartida financeira para os indivíduos que as tenham cedido. Assim, não está previsto qualquer pagamento de eventuais despesas derivadas da sua participação.

Para garantir a privacidade das pessoas participantes e a confidencialidade e proteção dos dados, as amostras de produtos biológicos e os eventuais dados demográficos e clínicos correspondentes serão pseudoanonimizados e tratados exclusivamente por pessoal sujeito a sigilo profissional.

Este estudo envolve várias instituições Nacionais e Internacionais, nomeadamente o Centro de investigação em Saúde de Angola, o Hospital Materno Infantil Dr Manuel Pedro Azancot de Menezes e a Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa.

Cortar pelo picotado – Informação de cima fica com responsável legal da criança, porção de baixo arquivar no CISA

Código do participante: _____ (a preencher pelo investigador)

1 Li a informação fornecida ao participante. Tive oportunidade de analisar as informações, de colocar as questões que julguei necessárias e de obter respostas satisfatórias.

2 Tomei conhecimento de que a minha participação e do meu filho/a é voluntária e de que posso desistir em qualquer altura, sem necessidade de justificação e sem prejuízo para os meus direitos assistenciais ou legais. A equipa de profissionais de saúde mantém o direito, contudo, de utilizar quaisquer amostras colhidas antes da desistência, de forma confidencial.

3 A equipa de profissionais de saúde poderá entrar em contacto comigo para informar do resultado da análise e colher amostras e recolher informações pessoais depois de eu ter dado o meu consentimento para participar neste estudo.

4 Autorizo a equipa de profissionais de saúde a transferir as amostras e/ou dados pessoais, de forma codificada para proteger a minha identidade, com fim de as analisar.

5 Os meus dados de contacto podem ser conservados exclusivamente para esta finalidade e não serão divulgados a terceiros.

6 Tenho conhecimento de que não receberei eu nem o meu filho/a qualquer contrapartida financeira pela participação neste estudo.

Se concorda com a proposta que lhe foi feita, queira **assinar este documento**.

Declaro ter lido e compreendido este documento, bem como as informações verbais que me foram fornecidas pela pessoa que acima assina. Foi-me garantida a possibilidade de, em qualquer altura, recusar participar neste projeto sem qualquer tipo de consequências. Desta forma, aceito participar e permito a utilização dos dados que de forma voluntária forneço, confiando em que apenas serão utilizados para este estudo e nas garantias de confidencialidade e anonimato que me são dadas pelo profissional de saúde.

Eu (nome do inquirido) _____, na qualidade de responsável legal do recém nascido

Data: __/__/__ **Assinatura ou impressão digital:** _____

Eu, _____ (nome do médico), forneci as explicações referidas neste termo de consentimento e assegurei-me que o participante percebeu a pertinência e implicações deste estudo.

Data: __/__/__ **Assinatura do médico:** _____

Investigador responsável: Dra Manuela Mendes

Contactos: Hospital Materno Infantil Dr Manuel Pedro Azancot de Menezes; e-mail: manuelamendes53@gmail.com

