

Seminários do DGH, 17 de Novembro de 2021

## Caracterização molecular de Hemoglobinopatias na população portuguesa – um subestudo do projeto INSEF



Daniela Santos (daniela.santos@insa.min-saude.pt)

Trabalho orientado por:

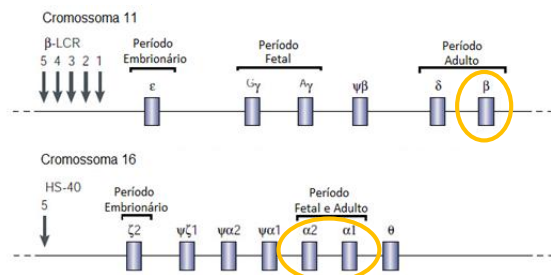
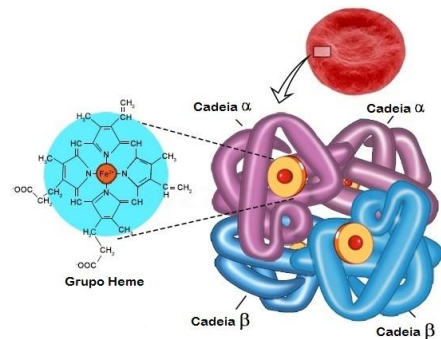
Doutora Paula Faustino (paula.faustino@insa.min-saude.pt) - Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge

Professora Doutora Deodália Dias (dmdias@fc.ul.pt) - Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa

### Introdução

## Hemoglobina

- ❖ Proteína essencial para a vida humana que transporta oxigénio dos pulmões para os tecidos.
- ❖ A hemoglobina humana principal no adulto é a hemoglobina A -  $\alpha_2\beta_2$ .
- ❖ Cada subunidade polipeptídica possui um grupo heme - ião de ferro contido num anel de porfirina.

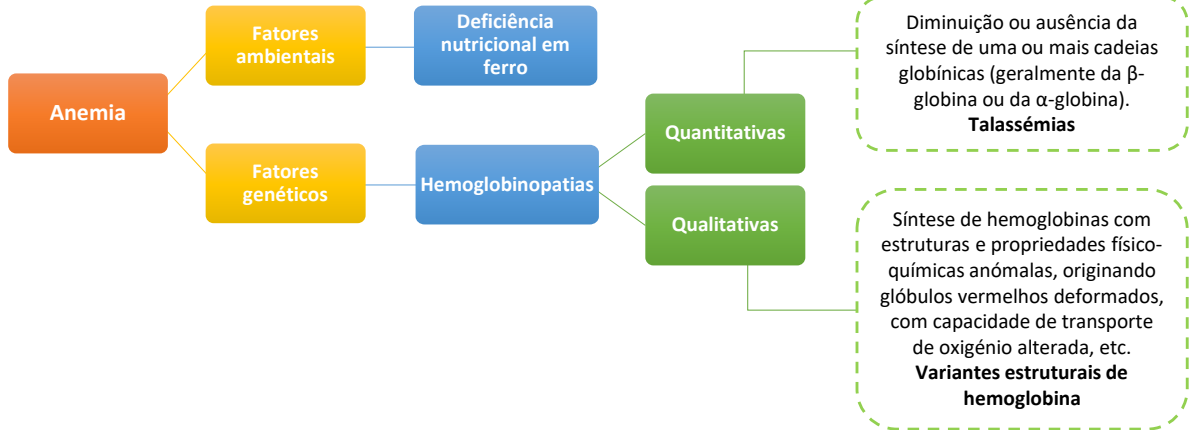


- ❖ O gene da  $\beta$ -globina (*HBB*) localizado no agrupamento génico no cromossoma 11 codifica para a cadeia da  $\beta$ -globina.
- ❖ Os genes da  $\alpha$ -globina (*HBA2* e *HBA1*) localizados no agrupamento génico no cromossoma 16 codificam para a cadeia da  $\alpha$ -globina.

Introdução

# Anemia

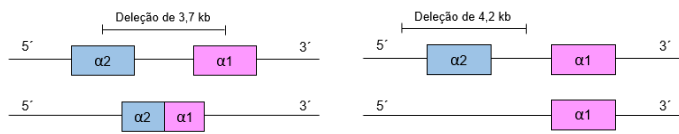
“ A anemia é uma condição na qual o número de glóbulos vermelhos ou a sua capacidade de transportar oxigênio é insuficiente para atender às necessidades fisiológicas, que variam de acordo com a idade, sexo, altura, tabagismo e gravidez. ” -WHO



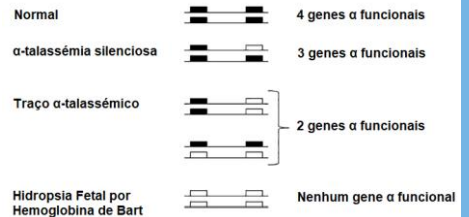
Introdução

# Talassémias: α-talassémia

**Défice na produção das cadeias de α-globina** geralmente causado por deleções em um ou mais dos quatro genes da α-globina.



Genótipos comuns	Número de genes α-globínicos normais	Nome	Fenótipo
αα/αα	4	Indivíduo normal	Normal
αα/α-	3	α-talassémia silenciosa	Sem alterações hematológicas ou ligeira microcitose e/ou hipocromia
--αα ou α-/α-	2	Traço α-talassémico	α-talassémia <i>minor</i> : indivíduos com ligeira anemia microcítica e/ou hipocrômica
--/α-	1	Doença Hb H	α-talassémia <i>intermédia</i> : indivíduos com anemia microcítica e/ou hipocrômica moderada a grave
--/--	0	Hidropsia Fetal por Hemoglobina de Bart	α-talassémia <i>major</i> : hidropsia fetal



## Introdução

Talassémias:  $\beta$ -talassémia

**Diminuição da síntese das cadeias de  $\beta$ -globina** geralmente devido a mutações pontuais no gene *HBB* ou na sua região regulatória proximal (promotor), pequenas deleções limitadas ao gene *HBB*, ou mais raramente devido a grandes deleções no agrupamento génico da  $\beta$ -globina ou na região regulatória distal (LCR).

Genótipos comuns	Nome	Fenótipo
$\beta/\beta$	Indivíduo normal	Normal
$\beta/\beta^0$ ou $\beta/\beta^+$	Traço $\beta$ -talassémico	$\beta$ -talassémia <i>minor</i> : indivíduos assintomáticos, com microcitose e/ou hipocromia ligeira e eventualmente anemia.
$\beta^0/\beta^+$ ou $\beta^+/ \beta^+$	$\beta$ -talassémia intermédia	Indivíduos com anemia microcítica e/ou hipocrômica ligeira a moderada, possível hematopoiese extramedular e sobrecarga em ferro
$\beta^0/\beta^0$	$\beta$ -talassémia <i>major</i>	Indivíduos dependentes de transfusão, com anemia microcítica e/ou hipocrômica grave, hematopoiese extramedular e sobrecarga em ferro

## Introdução

## Prevalência das hemoglobinopatias a nível mundial e em Portugal

## A nível mundial

- As hemoglobinopatias são predominantes em regiões que são ou foram endémicas de **malária**: Bacia do Mediterrâneo, Sudeste Asiático, África Subsariana, Médio Oriente e Índia.
- A migração populacional tem vindo a alterar a distribuição das hemoglobinopatias.
- Atualmente, nalguns países da Europa, as hemoglobinopatias tornaram-se num problema de saúde pública.

## Em Portugal

 **$\beta$ -talassémia:**

- Prevalência de 0,45% e distribuição heterogénea no país (Martins *et al.*, 1993, *Journal of Medical Genetics*);
- Quatro mutações  $\beta$ -talassémicas mais comuns: Cd39 (C>T), IVS-I-1 (G>A), IVS-I-6 (T>C) e IVS-I-110 (G>A) (Faustino *et al.*, 1999, *British Journal of Haematology*).


 **$\alpha$ -talassémia:**

- Prevalência de 10% de portadores e predomínio da deleção de 3,7 kb (Peres *et al.*, 1995, *Acta Médica Portuguesa*).

## Introdução

## Diagnóstico e Tratamento

Volume Globular Médio < 80 fL

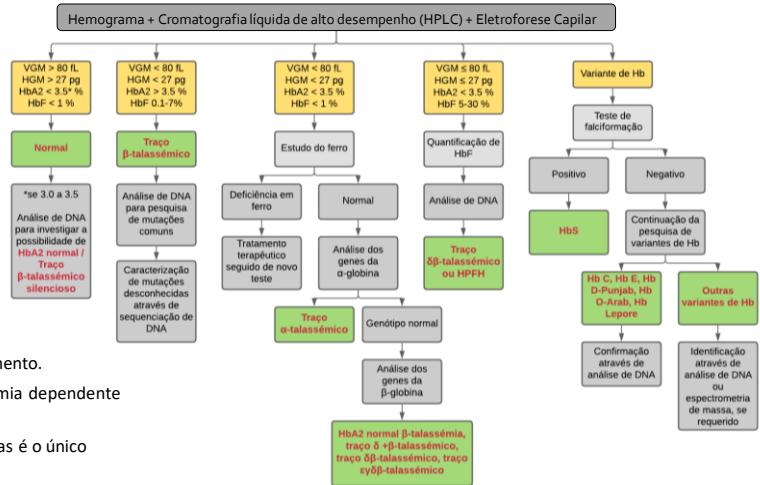
Microcitose 

Hemoglobina Globular Média < 27 pg

Hipocromia 

## Tratamento

- ❖ Hemoglobinopatias ligeiras não requerem tratamento.
- ❖ Hemoglobinopatias graves resultantes numa anemia dependente de transfusões, danos nos órgãos ou morte.
- ❖ O transplante de células estaminais hematopoiéticas é o único tratamento curativo.
- ❖ As principais opções terapêuticas baseiam-se nas transfusões de sangue periódicas combinadas com terapias de quelação do ferro.



Esquema adaptado de *Prevention and Diagnosis of Haemoglobinopathies: A Short Guide for Health Professionals and Laboratory Scientists*, 2016, pp. 1–79.

## Objetivos

Contribuir para o conhecimento da realidade atual das hemoglobinopatias em Portugal:

1

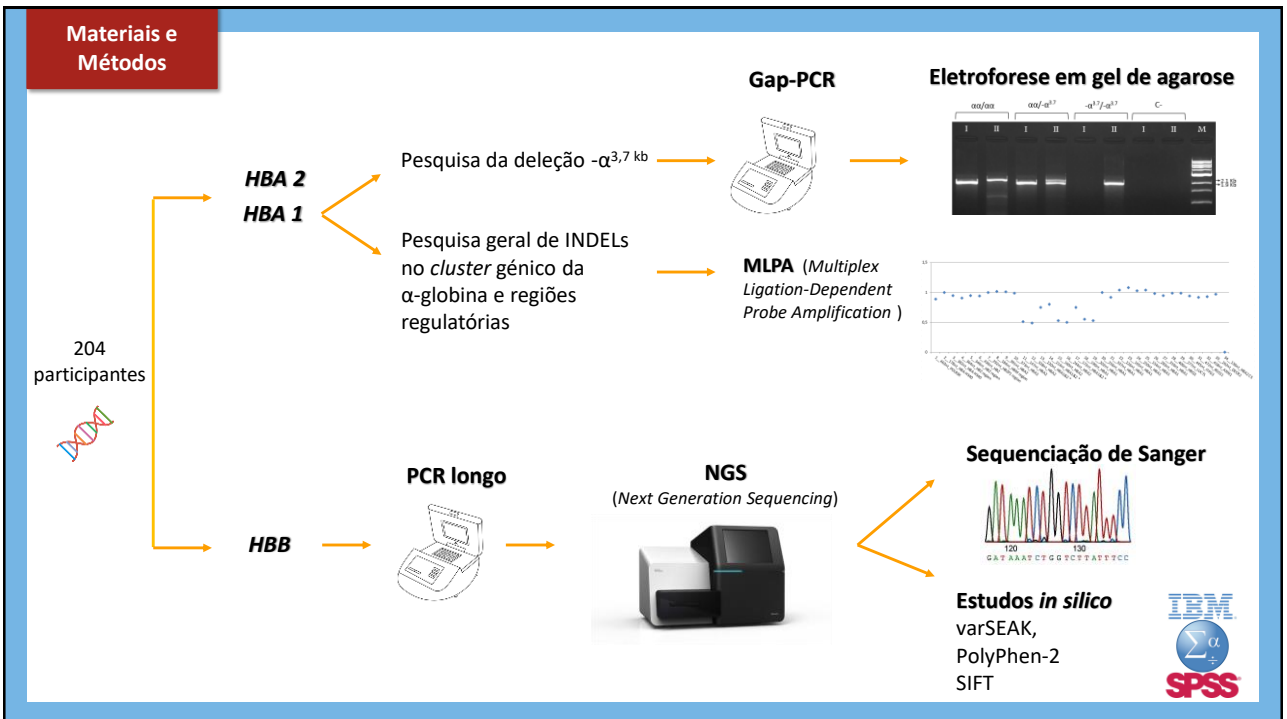
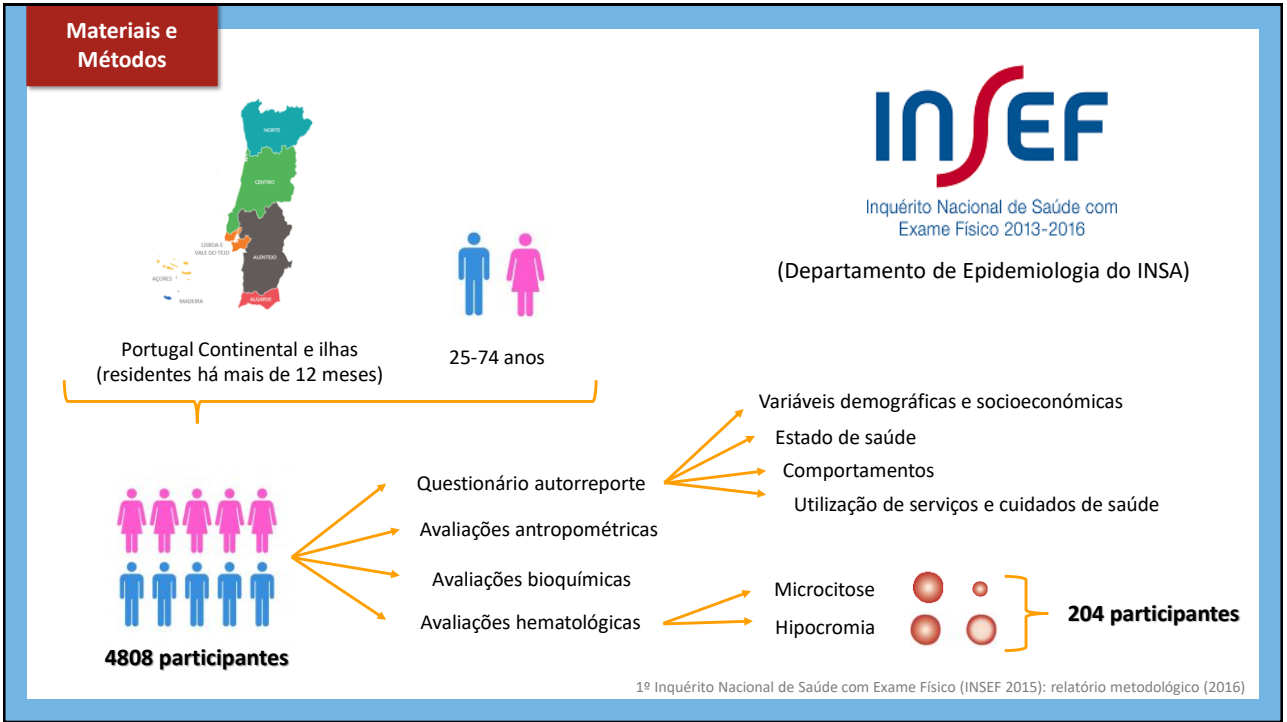
Identificar os casos de hemoglobinopatias e determinar a sua base molecular na população avaliada no projeto INSEF com fenótipo hematológico de hipocromia e/ou microcitose.

2

Determinar a frequência das diferentes hemoglobinopatias nos participantes do projeto INSEF e o seu padrão de distribuição geográfica. Determinar a prevalência da β-talassémia na população residente em Portugal.

3

Descrever as características demográficas e de saúde dos indivíduos identificados como portadores de uma hemoglobinopatia, nomeadamente: sexo, nacionalidade, perceção de saúde, existência de acompanhamento por médico de família e autorreporte de anemia.



Resultados e  
DiscussãoDiagnóstico de alterações nos genes *HBA1* e *HBA2*:  
 $\alpha$ -talassémia

	Genótipos	Frequência absoluta	Frequência relativa
Gap-PCR	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	148	72,6%
	$-\alpha^{3,7}/-\alpha^{3,7}$	1	0,5%
	$\alpha\alpha/-\alpha^{3,7}$	52	25,5%
MLPA	$\alpha\alpha/-\alpha^{4,2}$	1	0,5%
	$\alpha\alpha/\alpha\alpha^{\text{an}\Delta 3,7}$	2	0,9%

**54 indivíduos** dos 204 participantes do INSEF com fenótipo de microcitose e/ou hipocromia têm  **$\alpha$ -talassémia (26,6%)**

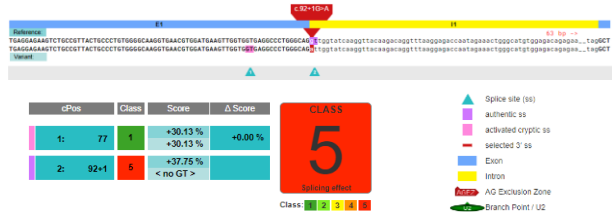
- ❖ A deleção  $-\alpha^{3,7}$  é a lesão molecular maioritariamente associada à  $\alpha$ -talassémia na população residente em Portugal.
- ❖ A  $\alpha$ -talassémia é uma causa considerável para a existência de um fenótipo hematológico de microcitose e/ou hipocromia.
- ❖ Estes resultados deverão alertar os clínicos para a necessidade da pesquisa da  $\alpha$ -talassémia como possível causa de um fenótipo de microcitose e/ou hipocromia.

Resultados e  
DiscussãoDiagnóstico de alterações no gene *HBB*:  
 $\beta$ -talassémia e variantes de hemoglobina

Foram identificadas 29 variantes genéticas diferentes, das quais 10 são possivelmente patogénicas

Posição (GRCh38.p12)	rs_ID	Nome Comum	Região	Consequência molecular	NM_000518.5	NP_000509.1
g.5225678	rs33946267	Hb D-Portugal	Exão 3	Var <i>Missense</i>	c.364G>C	p.Glu122Gln
g.5226762	rs80356821	C641:42 (-CTTT)	Exão 2	Var <i>Frameshift</i>	c.126_129del	p.Phe42LeufsTer19
g.5226774	rs11549407	Cd39 (C>T)	Exão 2	Var <i>Nonsense</i>	c.118C>T	p.Gln40Ter
g.5226820	rs35004220	IVS-1-110 (G>A)	Intrão 1	Var <i>Intrónica</i>	c.93-21G>A	-
g.5226924	rs35724775	IVS-1-6 (T>C)	Intrão 1	Var <i>Intrónica</i>	c.92+6T>C	-
g.5226929	rs33971440	IVS-1-1 (G>A)	Intrão 1	Var <i>Intrónica</i>	c.92+1G>A	-
g.5226974	rs34716011	Cd15 (G>A)	Exão 1	Var <i>Nonsense</i>	c.48G>A	p.Tip16Ter
g.5227001	rs63749819	Cd6 (-A)	Exão 1	Var <i>Frameshift</i>	c.20del	p.Glu7GlyfsTer13
g.5227002	rs334	Hb S	Exão 1	Var <i>Missense</i>	c.20A>T	p.Glu7Val
g.5227003	rs33930165	Hb C	Exão 1	Var <i>Missense</i>	c.19G>A	p.Glu7Lys

Sequência transcrita ENST00000335295.4



Análise do impacto da alteração **c.92+1G>A** no processo de *splicing* do RNA da  $\beta$ -globina através do software varSEAK.

**Resultados e  
Discussão**

## Diagnóstico de alterações no gene *HBB*: $\beta$ -talassémia e variantes de hemoglobina

Genótipos	Frequência absoluta	Frequência relativa
<i>Genótipos heterozigóticos</i>		
Hb D-Portugal	1	0,5%
Cd41/42 (-C111)	1	0,5%
Cd39 (C>T)	8	3,9%
IVS-I-110 (G>A)	3	1,5%
IVS-I-6 (T>C)	4	1,9%
IVS-I-1 (G>A)	3	1,5%
Cd15 (G>A)	2	0,9%
Cd6 (-A)	1	0,5%
Hb S	1	0,5%
Hb C	1	0,5%
<i>Genótipos homozigóticos</i>		
Sem alterações no gene <i>HBB</i>	179	87,8%

A Hb D-Portugal por si só é geralmente

- assintomática → avaliação do *status* do ferro, para confirmar uma possível anemia ferropénica
- Especial incidência na população chinesa.
- Ainda não foi reportada na população com origem portuguesa

Mutações  $\beta$ -talassémicas mais comuns na população portuguesa

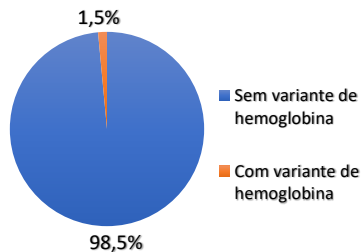
5ª e 6ª mutações  $\beta$ -talassémicas mais comuns na população portuguesa

- Maior prevalência na região africana.
- Indivíduo com Hb S com origem angolana.
- Avaliação do histórico familiar do indivíduo com o alelo Hb C .

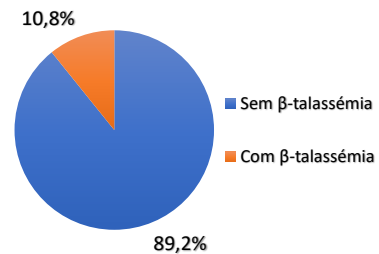
**Resultados e  
Discussão**

## Frequência da $\beta$ -talassémia e das variantes de hemoglobina

Frequência das variantes de hemoglobina nos **204 participantes** do INSEF com fenótipo de microcitose e/ou hipocromia



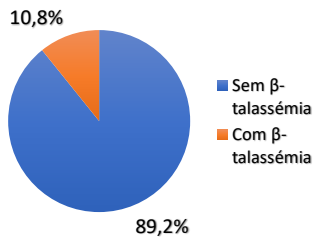
Frequência da  $\beta$ -talassémia nos **204 participantes** do INSEF com fenótipo de microcitose e/ou hipocromia



Resultados e  
Discussão

## Prevalência da $\beta$ -talassémia na população residente em Portugal em 2015

Frequência da  $\beta$ -talassémia nos **204 participantes** do INSEF com fenótipo de microcitose e/ou hipocromia



No total de **4808 participantes** do INSEF

Frequência de  $\beta$ -talassémia: **0,5%**

Na **população residente em Portugal em 2015**

Frequência de  $\beta$ -talassémia:  **$\approx$  0,3%**

[Intervalo de Confiança de 95%:  
0,1-0,6%]

Prevalência de  $\beta$ -talassémia na população portuguesa de 0,45%.

Martins et al., 1993,  
*Journal of Medical Genetics*

Resultados e  
Discussão

## Frequência das hemoglobinopatias nos indivíduos sintomáticos

### $\alpha$ -talassémia

- 54 indivíduos portadores;
- Frequência de 26,6%.

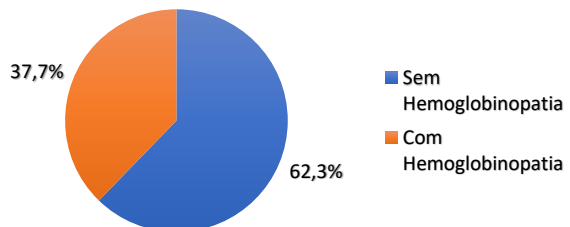
### $\beta$ -talassémia

- 22 indivíduos portadores;
- Frequência de 10,8%.

### Variantes de Hemoglobina

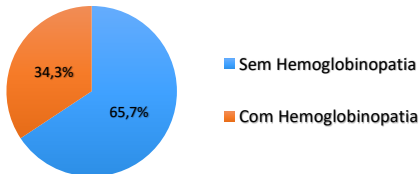
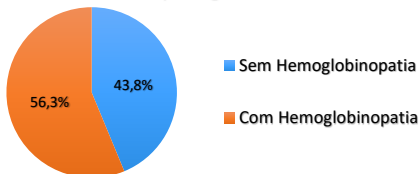
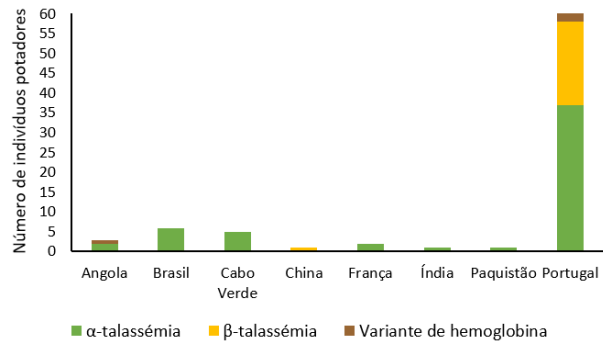
- 3 indivíduos portadores;
- Frequência de 1,5%.

Frequência das hemoglobinopatias nos **204 participantes** do INSEF com fenótipo de microcitose e/ou hipocromia



**Resultados e  
Discussão**

## Associação das hemoglobinopatias com as características demográficas: nacionalidade

**Hemoglobinopatias nos indivíduos portugueses**

**Hemoglobinopatias nos indivíduos não portugueses**

**Distribuição dos portadores de hemoglobinopatias pelos seus países de origem**

**Resultados e  
Discussão**

## Associação das hemoglobinopatias com as características demográficas: distribuição geográfica

**Norte**

7 indivíduos portadores de α-talassémia  
1 indivíduo portador de β-talassémia

**Centro**

3 indivíduos portadores de α-talassémia  
6 indivíduos portadores de β-talassémia

**Lisboa e Vale do Tejo**

16 indivíduos portadores de α-talassémia  
1 indivíduo portador de variante de Hb

**Alentejo**

6 indivíduos portadores de α-talassémia  
4 indivíduos portadores de β-talassémia

**Algarve**

5 indivíduos portadores de α-talassémia  
5 indivíduos portadores de β-talassémia  
1 indivíduo portador de variante de Hb

**Madeira**

14 indivíduos portadores de α-talassémia  
4 indivíduos portadores de β-talassémia

**Açores**

3 indivíduos portadores de α-talassémia  
2 indivíduos portadores de β-talassémia  
1 indivíduo portador de variante de Hb



## Resultados e Discussão

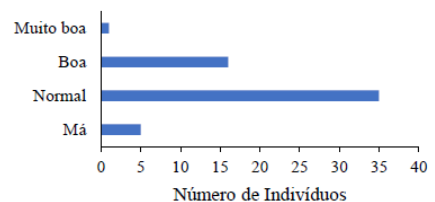
# Associação das hemoglobinopatias com as características de saúde

Circular Normativa da DGS nº 18/DSMIA de 2004, onde são definidas as condutas e regras para a prevenção das formas graves de hemoglobinopatias.

É recomendada a deteção precoce de adultos portadores de hemoglobinopatias, cujo primeira etapa passa pela solicitação do hemograma.

- ❖ Dos 77 indivíduos portadores de uma hemoglobinopatia, **57 indivíduos possuem médico de família.**
- ❖ Dos 160 indivíduos que possuem médico de família, 76 têm anemia, mas **apenas 2 indivíduos fizeram o seu autorreporte.**

Perceção de saúde dos indivíduos portadores de hemoglobinopatias e com médico de família



## Conclusões

Validámos a base molecular mais frequentemente associada à  $\alpha$ -talassémia sintomática na população residente em Portugal:  $-\alpha^{3,7kb}$ .

Concluimos que a  $\alpha$ -talassémia é uma causa considerável para a existência de um fenótipo hematológico de microcitose e/ou hipocromia: **frequência de  $\alpha$ -talassémia sintomática de 26,6%**.

Validámos a base molecular mais frequentemente associada à  $\beta$ -talassémia em Portugal: **Cd39 (C>T), IVS-I-1 (G>A), IVS-I-6 (T>C), IVS-I-110 (G>A), Cd15 (G>A) e Cd6 (-A)**.

Validámos a **prevalência de portadores de  $\beta$ -talassémia** na população residente em Portugal continental e ilhas em 2015: **semelhante ao reportado anteriormente.**

Detetámos **casos de hemoglobinopatias em todas as regiões de Portugal continental e ilhas**. Não foi possível estabelecer um padrão de distribuição geográfico.

Verificámos que **37,7% dos fenótipos de hipocromia e/ou microcitose são justificados por uma doença genética: uma hemoglobinopatia.**

## Estudos Futuros

- ❖ **Avaliação do status do ferro** dos indivíduos que ficaram com o seu fenótipo de hipocromia e/ou microcitose por esclarecer → Possível anemia ferropénica.
- ❖ **Pesquisa de alterações delecionais e não-delecionais nos genes *HBA2* e *HBA1*** na totalidade dos participantes do INSEF, de modo a ser possível concluir sobre a prevalência da  $\alpha$ -talassémia na população portuguesa.
- ❖ **Realização de um novo estudo epidemiológico**
  - Amostragem total maior e ajustada face ao número de habitantes por região, de modo a obter um padrão de distribuição geográfica e prevalência fidedigna de portadores de hemoglobinopatias.
  - Incluir a análise bioquímica de hemoglobinas previamente à análise molecular, para a deteção de variantes de hemoglobina (HbS e outras).
- ❖ **Reforço da atividade do Programa Nacional de Controlo de Hemoglobinopatias** através de ações de formação aos médicos de medicina geral e familiar.



## Agradecimentos



### Departamento de Genética Humana do INSA

#### Hemoglobinopatias, Metabolismo do Ferro e Patologias Associadas

- Paula Faustino
- Pedro Lopes
- Marisa Silva
- Isabel Germano

#### Unidade de Tecnologia e Inovação

- Joana Mendonça
- Miguel P. Machado
- Luís Vieira

#### Departamento de Epidemiologia do INSA

- Marta Barreto
- Irina Kislaya
- Carlos Matias-Dias



Instituto Nacional de Saúde  
Doutor Ricardo Jorge

