

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ANIMAL



Genotipagem da mutação G829A no gene
da piruvato cinase em indivíduos da Guiné-
Bissau e sua associação com a malária

Sara Cristina Inês Simões Pateira

Dissertação

Mestrado em Biologia Humana e Ambiente

2013

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ANIMAL



Genotipagem da mutação G829A no gene da piruvato cinase em indivíduos da Guiné-Bissau e sua associação com a malária

Sara Cristina Inês Simões Pateira

Dissertação

Mestrado em Biologia Humana e Ambiente

Orientadores:

Octávio Paulo, Ph.D

Ana Paula Arez, Ph.D

2013

Esta dissertação era inicialmente para ser sobre outra temática e como tal para ser orientado pelo Doutor Rui Moutinho Sá e pela Doutora Manuela Alvarez, devido a vários constrangimentos no projecto a temática inicial foi alterada e foi adicionada como orientadora a Doutora Ana Paula Arez.

As referências bibliográficas nesta dissertação estão de acordo com as normas da revista *British Journal of Haematology*.

A escrita desta dissertação não segue as regras do novo acordo ortográfico.

Agradecimentos

A realização desta dissertação só foi possível com o apoio de várias pessoas às quais quero agora agradecer, em especial:

Ao Professor Doutor Octávio Paulo, pela oportunidade que me ofereceu, pelos conselhos e ajudas que me deu e especialmente por nunca ter desistido de tornar esta tese possível, mesmo com todos os contratemplos que surgiram.

À Investigadora Doutora Ana Paula Arez, por me ter aceite tão prontamente e de braços abertos e por muito ter contribuído com conselhos, ajudas e opiniões que tornaram esta dissertação muito melhor.

À Doutora Patrícia Isabel Machado, por me ter ajudado vezes sem conta dando ideias e ajudas impagáveis sem as quais esta tese não seria de todo possível. Agradeço também pelo apoio, o carinho e o incentivo que sempre me deu e que me ajudou imenso a nunca desanimar.

À técnica Isabel Picanço do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA), por toda a disponibilidade demonstrada, pelos ensinamentos facultados, pela inestimável ajuda dada e claro, pelo imenso carinho e dinamismo que transmite a quem a rodeia. Agradeço também a ajuda sempre pronta, o carinho e acolhimento fantástico de todos no Departamento de Promoção da Saúde e Prevenção de Doenças Não Transmissíveis do INSA, em especial da Doutora Astrid Moura Vicente, que disponibilizou prontamente o seu laboratório para a execução deste trabalho e me pôs em contacto com a Isabel para que tudo isto fosse possível.

Ao Doutor Rui Moutinho Sá e à Doutora Manuela Alvarez por terem feito parte deste projecto.

A todos os meus colegas de grupo/laboratório por estarem sempre prontos a ajudar, especialmente, à Patrícia Brás que tanta paciência teve comigo no laboratório e sempre me deu conselhos úteis e incentivo, e claro, ao João Silva que fez parte da minha vida não apenas ao longo deste ano de tese, mas de todo o meu percurso académico.

Sendo sempre um óptimo amigo que me incentivou e apoiou do primeiro ao último momento nesta instituição.

À Professora Doutora Deodália Dias, que me tem acompanhado ao longo do mestrado, e que sempre se disponibilizou para me ajudar e motivar ao longo destes anos.

A todos os meus meninos fantásticos (de todas as gerações) que tanto apoio me têm dado ao longo destes anos, em especial à Vânia, ao Joaquim, ao Rúben e ao Victor por tanto me terem ajudado, apoiado, confortado, por terem secado as minhas lágrimas sempre que foi preciso, por me terem animado sempre, e em especial por sempre me terem amado muito, mesmo quando estou ruim de aturar.

A todos os meus amigos de dentro e fora da faculdade que têm dado apoio e incentivo constante, especialmente às minhas meninas de sempre (Marina, Sara, Solange e Joana) por serem sempre extraordinárias ao longo de praticamente uma vida, por me terem apoiado sempre incondicionalmente, por se preocuparem e tentarem ajudar-me sempre da melhor maneira possível, por me incentivarem a sair à rua e contactar com o mundo exterior nos meus momentos de eremita e essencialmente por terem estado sempre lá mesmo quando me foquei só no que estava a fazer a vos negligenciei um pouquinho. Ao João que na minha vida acabou por ser bem mais que um amigo, tornou-se um anjo da guarda. Por me ter apoiado sempre e mesmo bem longe dizer sempre as palavras certas na hora certa e claro, pelos cafezinhos tomados nas tuas vindas a Portugal que são óptimos para o astral e renovam a força para trabalhar.

A toda a minha família pelo carinho, apoio e incentivo que sempre me deram que muito ajudou a chegar até aqui.

Por fim, porque o melhor vem sempre no fim, aos meus pais. Sem eles não podia ser o que sou hoje nem chegar até onde cheguei. Um imenso obrigada por todo o esforço e sacrifício que fizeram para me permitir chegar até aqui e por todo o amor e carinho que sempre me deram e que fizeram de mim uma pessoa melhor e mais feliz.

Resumo

A malária é uma doença provocada por um parasita protozoário do género *Plasmodium*, que é transmitida por mosquitos do género *Anopheles* e que pode acarretar um grande conjunto de complicações, podendo em muitos casos levar mesmo à morte. Esta doença é uma das mais incidentes nos continentes africano, asiático e sul-americano e tem uma incidência mundial de cerca de 216 milhões de casos.

A elevada mortalidade e o grande impacto desta doença fazem com que ela seja considerada como uma das maiores forças selectivas evolucionárias da história recente da humanidade. O impacto que esta doença tem na evolução Humana, faz com que as variantes dos genes que permitam ao seu portador uma resistência à malária ou uma atenuação dos seus sintomas, tenham vindo a ser conservados ao longo dos tempos. Até agora já foram encontrados vários genes que aparentam desempenhar esta função, entre os quais se encontram alguns que regulam a produção de enzimas, como é o caso do gene PKLR (*pyruvate kinase liver red cells*).

Foi recentemente observada uma nova mutação no gene PKLR (G829A;Glu277Lys), que parece estar associada à malária, uma vez que só tem sido encontrada em países onde a malária é endémica. Pretende-se então analisar e comparar a incidência desta mutação na Guiné-Bissau com os dados já obtidos, em Angola, Moçambique, São Tomé e Príncipe, Guiné Equatorial e o grupo controlo Portugal. Para a realização desta análise foi extraído o DNA genómico a partir de saliva recolhida em zaragatoa ou sangue recolhido em FTA's, Etanol e RNAlater. O exão 7 do gene PKLR foi amplificado e posteriormente sequenciado. A comparação da frequência da incidência desta mutação foi efectuada com recurso a programas de tratamento estatístico.

Observou-se então que a população da Guiné-Bissau, apesar de ser composta por um elevado número de etnias, tem uma frequência para esta mutação bastante semelhante às outras populações africanas. Devido a várias limitações no estudo não é possível estabelecer uma ligação directa entre a presença da mutação e a malária. No entanto, os dados deste estudo permitem fazer uma adenda aos dados já existentes para que no futuro ser possível fazer essa associação, se ela existir. É por isso muito

importante que se continuem a fazer estudos nesta área, no seguimento deste, mas mais aprofundados.

Palavras-chave: malária, deficiência na piruvato cinase, PKLR, mutação, G829A

Abstract

Malaria is a disease caused by a parasitic protozoan of the genus *Plasmodium*, which is transmitted by a mosquito of the genus *Anopheles* and can result in a wide range of complications, in many cases can even lead to death. This disease is one of the most incidents in the African, Asian and south American continents and has a worldwide incidence of approximately 216 million cases.

The high mortality and the major impact of this disease makes it to be considered as one of the greatest selective forces in the recent history of humankind. The impact that this disease has had in Human evolution causes that the variants of genes that allows some kind of resistance against to malaria, have been preserved over the time. Several genes that appear to play this role have been found, among which are some genes that regulate the enzymes production, such as the PKLR gene (pyruvate kinase liver red cells gene).

Recently, it has been observed a new mutation in the PKLR gene (G829A;Glu277Lys), that appears to be associated to malaria, since it has only been found in malaria endemic countries. The aim of this study is then analyze and compare the incidence of this mutation in Guinea-Bissau with the data already obtained in Angola, Mozambique, Sao Tome and Principe, Equatorial Guinea and the control group Portugal. In order to accomplish this analysis, genomic DNA was extracted from saliva swabs or blood collected in FTA's, Ethanol or RNAlater. The exon 7 of the PKLR gene was amplified and subsequently sequenced. The comparison of the frequency of incidence of this mutation was performed using statistical analysis programs.

It was then observed that the population of Guinea-Bissau, despite being composed by a huge number of ethnicities, has a frequency for this mutation quite similar to the other African populations. Due to several limitations of this study we were not able to establish a direct link between the presence of the mutation and the malaria. However, data from this study allows us to make an *addendum* to the existing data, so that in future it could be possible to make this association, if it exists. It is therefore very important that we continue to do further research in this area.

Keywords: malaria, deficiency in pyruvate kinase, PKLR, mutation, G829A

Índice

Agradecimentos	i
Resumo	iii
Abstract.....	v
Índice de Figuras	vii
Índice de Tabelas	viii
Abreviaturas.....	ix
I. Introdução	1
1. Malária	1
2. Piruvato cinase	7
3. Mutação G829A (Glu277Lys)	15
II. Objectivos do estudo	17
III. Materiais e Métodos.....	19
1. Grupos de estudo.....	19
2. Recolha de amostras	20
3. Extração do DNA	21
4. Selecção de <i>primers</i>	24
5. Amplificação do exão	24
6. Sequenciação do exão	28
7. Análise Estatística.....	28
IV. Resultados	30
1. Quantificação do DNA	30
2. Detecção da mutação	33
3. Análise dos Resultados	35
V. Discussão.....	36
VI. Considerações Finais.....	39
VII. Referências bibliográficas	40
Anexos.....	45

Índice de Figuras

Figura 1 – Classificação dos países de acordo com o estágio de eliminação da malária ..	2
Figura 2 – Ciclo de vida do <i>Plasmodium</i>	4
Figura 3 - Glicólise	8
Figura 4 – Estrutura cristalina tridimensional da piruvato cinase relaxada (no estado activo)	9
Figura 5 – Representação da reacção de polimerização em cadeia	25
Figura 6 – Fotografia de uma electroforese em gel de agarose do exão 7 do gene PKLR (350bp)	27
Figura 7 – Exemplo de um electroferograma obtido pela genotipagem de dois indivíduos: um homozigótico, sem mutação (electroferograma superior) e outro heterozigótico (electroferograma inferior)	27

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Número estimado de casos de malária e de morte associada à malária para 2010 pela OMS	2
Tabela 2 – Número de indivíduos por sexo e unidade hospitalar	19
Tabela 3 – Quantidade de cada um dos componentes utilizados em cada um dos modelos de mistura de reacção	26
Tabela 4 – Quantificação do DNA em ng/ μ L por espectrofotometria no nanodrop	30
Tabela 5 – Número de indivíduos portador de cada um dos genótipos	34
Tabela 6 - FST e o valor de p da comparação da população da Guiné Bissau com as outras populações africanas	35

Abreviaturas

2,3-DPG – 2,3-difosfoglicerato; *2,3-diphosphoglycerate*

ADP – Adenosina Difosfato

ATP – Adenosina Trifosfato

bp – Pares de Base; *Base pairs*

cDNA – Ácido Desoxidorribonucleico complementar; *Complementary Deoxyribonucleic acid*

EUA – Estados Unidos da América

FBP – Frutose Bifosfato; *Fructose biphosphate*

GSH – Glutathiona; *Glutathione*

HLA – Antígeno Leucocitário Humano; *Human leukocyte antigen*

kb – Quilo Pares de Base; *Kilo base pairs*

kDa – Quilo Dalton; *Kilo Dalton*

OMS – Organização Mundial de Saúde

PEP – Fosfoenolpiruvato; *Phosphoenolpyruvate*

PKL – Piruvato Cinase Específica do Fígado; *Pyruvate kinase liver specific*

PKLR – Piruvato Cinase do Fígado e dos Eritrócitos; *Pyruvate kinase liver and red blood cell*

PKM – Piruvato Cinase Muscular; *Pyruvate kinase muscle*

PKR – Piruvato Cinase Específica dos Eritrócitos; *Pyruvate kinase red cell specific*

PKR-RE1 – Elemento Regulatório 1 da Piruvato Cinase; *Pyruvate kinase regulatory element 1*

RNA- Ácido Ribonucleico; *Ribonucleic acid*

Aminoácidos

Ala – Alanina

Asn – Asparagina

Asp – Ácido Aspártico

Glu – Ácido Glutâmico

Gly – Glicina

His – Histidina

Ile – Isoleucina

Lys – Lisina

I. Introdução

1. Malária

A malária é uma doença que afecta 26 milhões de pessoas, segundo os dados reportados à OMS em 2012, o que gerou 106.820 mortes reportadas. Como o número total de casos é bem maior que o número de casos reportados, a OMS estimou que em 2010 ocorreram cerca de 219 milhões de casos de malária, que se estima tenham resultado em cerca de 660 mil mortes (Tabela 1). Estimaram também que a população em risco de contrair malária em 2011 era de 3,3 biliões de pessoas, espalhadas por 104 países (99 com transmissão de malária em curso e 5 que se encontram em prevenção para evitar reintrodução) (Figura 1). Apesar do número de países endémicos de malária ser tão grande, 80% das mortes por malária ocorre em apenas 14 países e 80% dos casos de malária ocorre em apenas 17 países, sendo a área mais afectada a África subsariana. A malária ainda se encontra amplamente ligada à pobreza, estando as maiores taxas de mortalidade associadas a países com menor produto nacional bruto *per capita* e maior população a viver abaixo do limiar da pobreza (World Health Organization, WHO, 2012). Apesar de actualmente a malária ser essencialmente endémica da América do Sul, de África e da Ásia, esta também já foi endémica do sul da Europa e da América do Norte, só tendo sido eliminada após o final da 2ª Guerra Mundial (Hedrick, 2011).

Tabela 1 Número estimado de casos de malária e de morte associada à malária para 2010 pela OMS (World Health Organization, WHO, 2012)

Região	Nº de casos estimados ('000s)				Nº de mortes estimadas			
	Estimativa	Valor Inferior	Valor Superior	% <i>P. falciparum</i>	Estimativa	Valor Inferior	Valor Superior	% <5
África	174 000	110 000	242 000	98%	596 000	429 000	772 000	91%
Américas	1 100	900	1300	35%	1 100	700	1 800	29%
Mediterrâneo Oriental	10 400	6 400	16 600	83%	15 300	7 200	23 500	70%
Europa	0,2	0,2	0,2	-	0	0	0	-
Sudeste Asiático	32 000	25 900	41 900	53%	43 000	31 100	60 300	32%
Pacífico Ocidental	1 700	1 300	2 100	79%	4 000	2 400	6 100	41%
Mundo	219 000	154 000	289 000	90%	660 000	490 000	836 000	86%

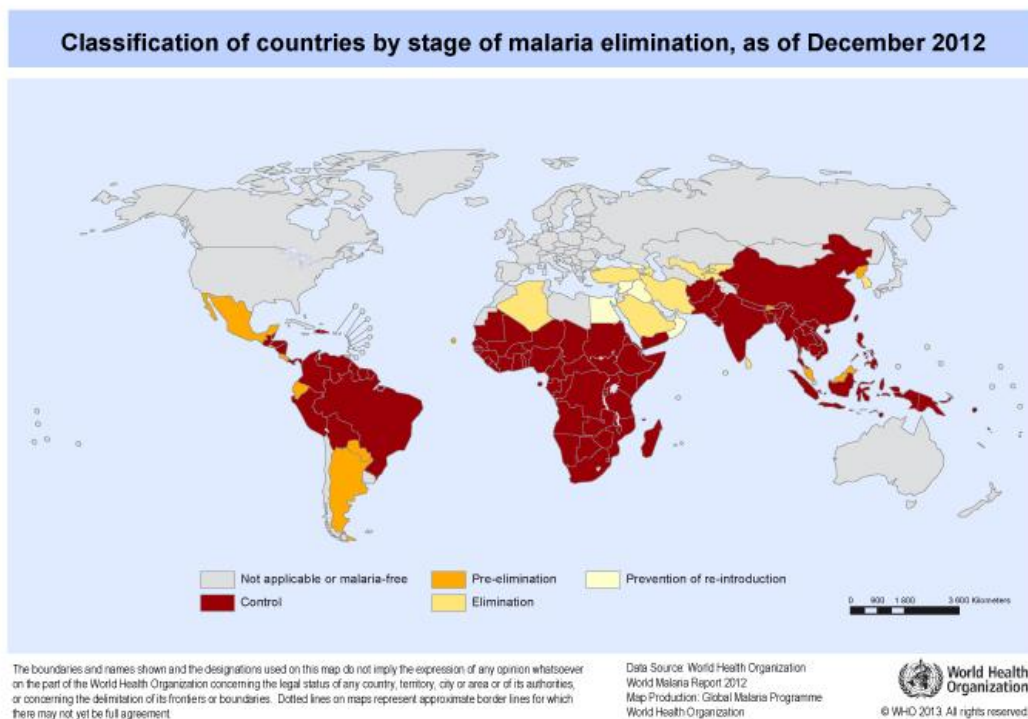


Figura 1: Classificação dos países de acordo com o estágio de eliminação da malária (http://gamapserv.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Endemic_Countries_2012.jpg)

A malária é causada por 5 espécies de parasitas da ordem *Haemosporida*, género *Plasmodium*, sendo elas *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae* e *Plasmodium knowlesi* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Undef&id=5820&lvl=3&srchmode=1&keep=1&unlock>; Hickman *et al*, 2008; World Health Organization, WHO, 2012). Os casos de malária devido a *P. falciparum* são os mais graves e são também os mais predominantes em África, os devido a *P. vivax* apesar de serem menos perigosos são que apresentam uma distribuição mais vasta a nível mundial, enquanto os casos devidos às outras três espécies são muito menos frequentes (World Health Organization, WHO, 2012).

A transmissão dos parasitas é feita através da picada de fêmeas de mais de 30 espécies de mosquitos do género *Anopheles* (sendo *An. gambiae*, *An. arabiensis* e *An. funestus* as principais espécies da Guiné-Bissau) (World Health Organization, WHO, 2012). Os humanos funcionam como hospedeiro intermediário e reservatório, enquanto os mosquitos funcionam como hospedeiro definitivo e vector. A infecção ocorre quando uma fêmea de *Anopheles* ingere sangue de um ser humano, que tem no seu sangue os estádios reprodutores maduros masculinos e femininos (gametócitos) do parasita. Inicia-se então um ciclo complexo de desenvolvimento e multiplicação – ciclo esporogónico - que começa pela união entre os gâmetas masculinos e femininos originados a partir dos gametócitos no estômago do mosquito, e termina com a formação dos esporozoítos que se acumulam nas glândulas salivares do mosquito. A transmissão, propriamente dita, ocorre quando o mosquito que apresenta esporozoítos nas suas glândulas salivares pica um humano (Figura 2). O tempo do processo de maturação do parasita (que ocorre no intestino médio do mosquito) é variável, e encontra-se dependente das temperaturas exteriores e da espécie de *Plasmodium* em causa (World Health Organization, WHO, 2012; Zucker, 1996).

Após a picada do mosquito, os esporozoítos entram no fígado e inicia-se a esquizogonia exoeritrócitária. O período de incubação dos parasitas no fígado varia de 6 a 15 dias, dependendo da espécie de *Plasmodium*. Os merozoítos libertados no ciclo esquizogónico no fígado invadem os glóbulos vermelhos, onde efectuam uma série de ciclos esquizogónicos eritrocitários. Os merozoítos entram nos glóbulos vermelhos,

logo após um ciclo no fígado, no entanto no caso do *P. vivax* e do *P. ovale* essa entrada pode nos glóbulos vermelhos pode ser retardada, uma vez que estas espécies formam hipnozoítos que ficam temporariamente dormentes, e só depois iniciam o ciclo no fígado. Após a entrada nos glóbulos vermelhos, os merozoítos transformam-se em trofozoítos ameboides e alimentam-se de hemoglobina. O produto final da digestão da hemoglobina pelo parasita é um pigmento escuro e insolúvel, a hemozoína. A hemozoína acumula-se nas células do hospedeiro (podendo também acumular-se no fígado, baço e outros órgãos), e liberta-se quando a nova geração de merozoítos é produzida. Um trofozoíto, dentro de um glóbulo vermelho, produz entre 6 a 36 merozoítos, dependendo da espécie, prontos a infectar novos glóbulos vermelhos. Quando os glóbulos vermelhos contendo merozoítos rebentam, libertam os produtos metabólicos do parasita que aí se acumularam. É a libertação destas substâncias na circulação sanguínea do paciente que faz com que ocorra a sintomatologia característica (Figura 2) (Hickman *et al*, 2008).

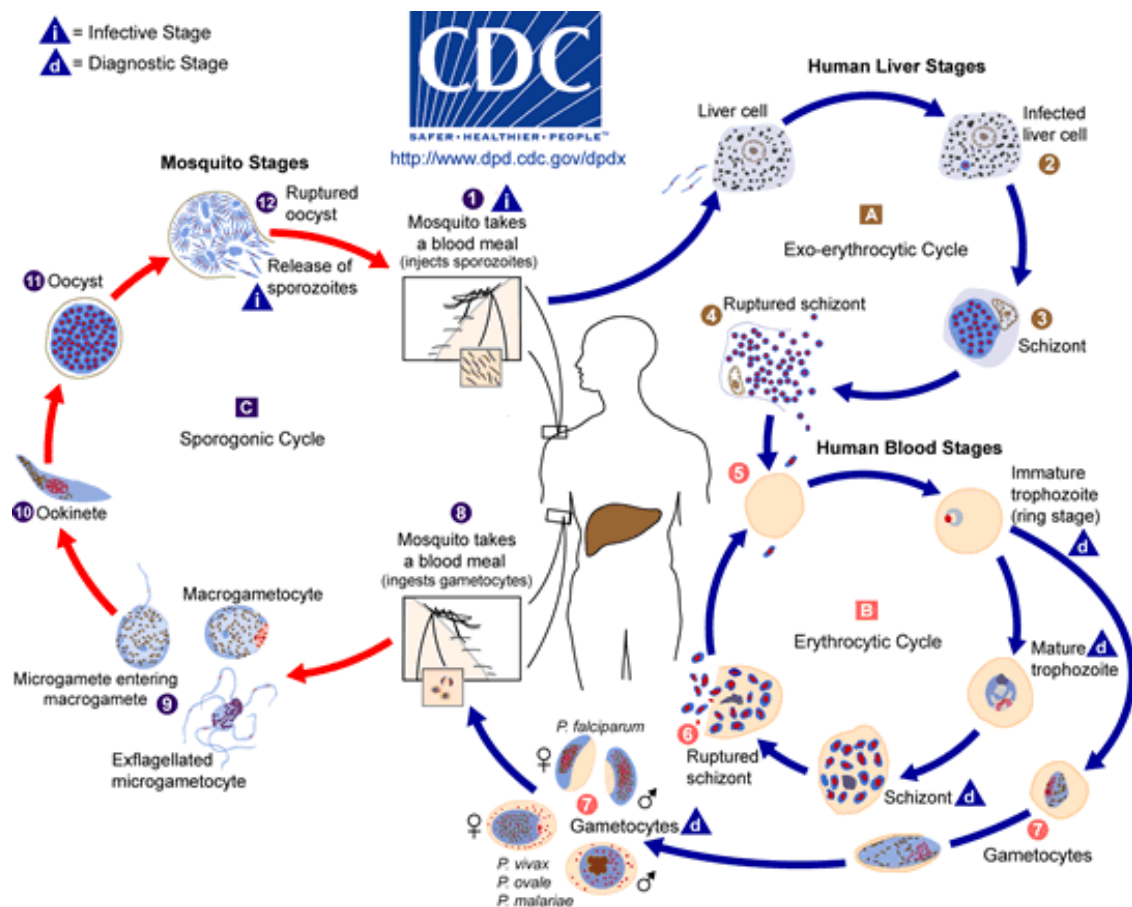


Figura 2 Ciclo de vida do *Plasmodium* (<http://www.cdc.gov/malaria/about/biology/>)

A doença apresenta um largo espectro de manifestações clínicas, sendo o sintoma mais característico a febre. Outros sintomas comuns incluem calafrios, suores, dores de cabeça, mialgias, náuseas, vômitos, diarreia, fraqueza, esplenomegalia, hepatomegalia, icterícia, hipotensão, dores abdominais, dores no corpo generalizadas, mal-estar geral e tosse. Com o desenvolvimento da doença alguns pacientes desenvolvem o cenário clássico de malária, que é caracterizado por crises da doença intercaladas com períodos sem qualquer tipo de sintoma. Os períodos de crise são compostos por 3 fases; a primeira fase dura entre 15 a 60 minutos, é considerada o estágio frio e é caracterizada por tremores e sensação de frio intenso; a segunda fase dura entre 2 a 6 horas, é considerado o estágio quente e é caracterizada por febres que chegam a alcançar picos de 41°C, o paciente cora, fica com a pele seca e geralmente ocorrem também dores de cabeça, náuseas e vômitos; a última fase dura entre 2 a 4 horas, é considerado o estágio do suor e é caracterizado pela queda rápida da temperatura e por suores. A periodicidade destas febres é variável de acordo com a espécie do parasita em causa. A periodicidade tende a ser bem definida, 48 horas para o *P. vivax* e o *P. ovale*, 72 horas para o *P. malariae* e 24 horas para o *P. knowlesi*. O caso do *P. falciparum* a febre tende a ser irregular, não mostrando uma periodicidade característica, apesar desta se aproximar das 48 horas. Esta irregularidade está associada à elevada taxa de multiplicação que rapidamente dessincroniza a periodicidade, e também ao facto de, por vezes, estarem várias populações (genótipos) presentes na mesma infeção (situação bastante comum) gerando assim ciclos assíncronos. No entanto, este padrão clássico não ocorre no início do desenvolvimento da malária, podendo em alguns casos nunca surgir. Nos casos de malária complicada ocorre o surgimento de complicações graves, sendo as mais comuns a malária cerebral (que tem uma taxa de mortalidade associada entre 15 a 50 %) e a anemia grave. Para além destes sintomas mais comuns, os casos de malária complicada apresentam também complicações como: hiperparasitemia, hemoglobinúria, hipoglicemia severa, acidose lática, hipertermia prolongada, choque, disfunções pulmonares, cardíacas, hepáticas ou renais, convulsões, sangramentos espontâneos, diarreia e vômitos exacerbados, pneumonia por aspiração e ruptura do baço, sendo em muitos casos fatal. Idosos, crianças, mulheres grávidas, pessoas imunodeprimidas e pessoas com doenças crónicas

são mais susceptíveis de desenvolverem malária complicada (Crutcher & Hoffman, 1996; <http://www.cdc.gov/malaria/about/disease.html>).

No passado, a taxa de mortalidade relativa à malária era ainda maior do que hoje em dia, especialmente em populações que nunca tinham estado expostas à malária, como foi o caso das populações europeias em África, por volta de 1800s. Pensa-se que o número de mortes referentes à malária aumentou há cerca de 5.000-10.000 anos atrás aquando do desenvolvimento da agricultura e da domesticação animal, devido ao facto de que estas actividades proporcionaram o aumento da densidade populacional humana e da densidade populacional do mosquito. Como resultado desta elevada taxa de mortalidade, da extensa difusão e do impacto da doença, a malária é considerada a maior força selectiva da história recente da humanidade. Como tal, os genes que conferem resistência à malária foram alvo de forte selecção positiva nos humanos modernos (Hedrick, 2011). Estes genes são extremamente diversificados podendo ser:

- Genes associados a proteínas e receptores na superfície dos glóbulos vermelhos
 - Mutação Duffy
 - Gene SLC4A1 (proteína da banda 3 do eritrócito)
 - Gene ABO (grupos sanguíneos)
- Genes associados ao sistema imunitário
 - Genes HLA-Bw53 e HLA-DQw5
 - Haplótipo HLA-DRB1*1302-DQB1*0501
- Genes associados a hemoglobinopatias
 - Hemoglobina variante S (Anemia falciforme)
 - Hemoglobina variante C
 - Hemoglobina variante E
 - α -talassémia
 - β -talassémia
- Genes associados a enzimopatias
 - Deficiência em glucose-6-fosfato desidrogenase (G6PD)
 - Deficiência em piruvato cinase (PK)

Devido cumulativamente quer ao elevado número de genes associados à resistência à malária, quer à dimensão da doença, é possível encontrar-se na mesma população vários

genes associados à resistência à doença (Hedrick, 2011; Verra *et al*, 2009; Allison, 2009).

O impacto da malária enquanto força selectiva, doença e o peso que esta tem a nível económico para os países afectados tem levado a um enorme crescendo do interesse no estudo da doença e de mutações que possam conferir alguma resistência à mesma.

2. Piruvato Cinase

A piruvato cinase é o enzima que catalisa o último passo da glicólise (Figura 3), que corresponde à transfosforilação do PEP em piruvato, através da utilização de ADP o que leva à síntese de ATP, sendo esta reacção irreversível a nível fisiológico. Para que a reacção ocorra é necessária a presença de K^+ e Mg^{2+} (ou Mn^{2+}). O PEP e o piruvato estão envolvidos em várias vias biossintéticas e energéticas e como tal a correcta regulação da piruvato cinase é de extrema importância não só para a glicólise, mas também para todo o metabolismo celular. Uma das principais características da piruvato cinase é a sua resposta alostérica a diversos efectores, alternando assim a sua natureza química (Valentini *et al*, 2002; Zanella *et al*, 2005; Zanella *et al*, 2007).

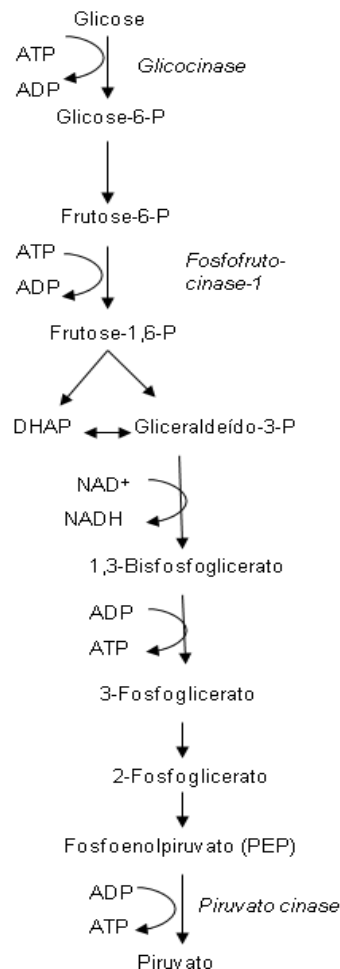


Figura 3: Glicólise (<http://pt.wikipedia.org/wiki/Ficheiro:Glicolise-gliconeogenese.png>)

A estrutura tridimensional das várias formas da piruvato cinase é extremamente conservada entre várias espécies, e é quase sempre um tetrâmero de aproximadamente 200-240 kDa composto por quatro subunidades idênticas. Ainda assim existem diferentes formas que variam entre monómeros e decâmeros. Cada uma das subunidades que constituem o enzima é composta por quatro domínios, três principais e um domínio mais pequeno. Os três domínios principais são o domínio A que apresenta uma topologia em barril (β/α)₈; o domínio B que é uma cadeia β , que se insere entre a cadeia β 3 e a hélice α 3 do domínio A; e o domínio C que possui uma topologia $\alpha+\beta$. O domínio mais pequeno, que se encontra ausente nos procariontes, é um pequeno domínio helicoidal N-terminal (Figura 4). As quatro subunidades do tetrâmero estão agregadas para formar um oligómero simétrico D₂. A interacção entre as subunidades define duas grandes áreas de contacto a interface A/A' que envolve os domínios A das subunidades ao longo do eixo vertical e a interface C/C' que abrange os domínios C das subunidades

ao longo do eixo horizontal (Valentini *et al*, 2002; Zanella *et al*, 2005; Zanella *et al*, 2007).

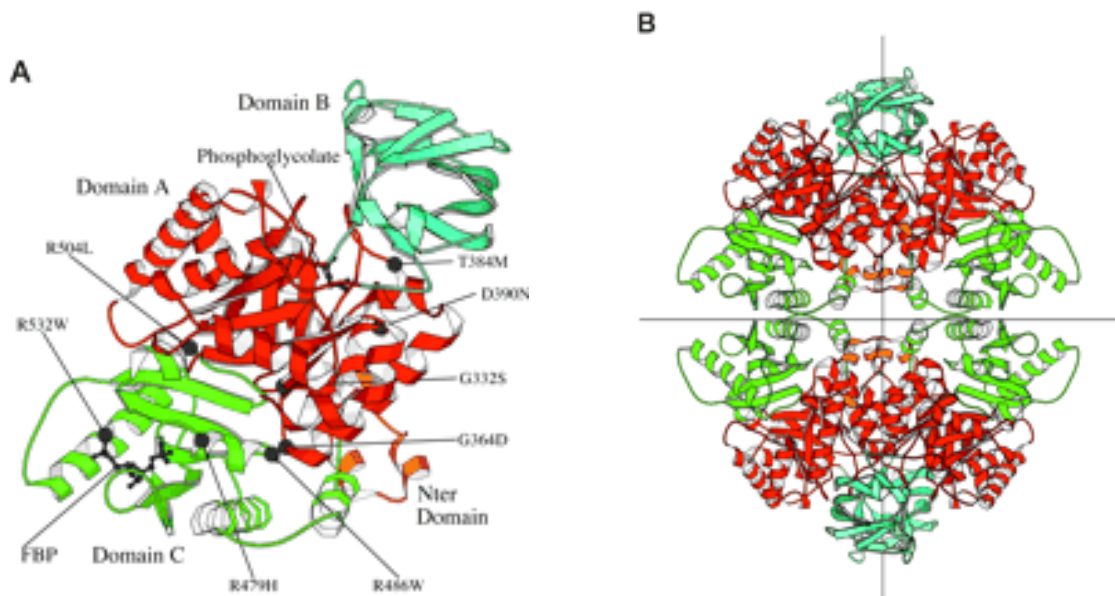


Figura 4: Estrutura cristalina tridimensional da piruvato cinase relaxada (no estado activo). O domínio N-terminal é amarelo, o domínio A é vermelho, o domínio B é azul ciano e o domínio C é verde. **A** Subunidade da piruvato cinase. As esferas cinzentas indicam os átomos Ca de resíduos subjacentes a mutações. **B** o tetrâmero da piruvato cinase. Um dos eixos moleculares é perpendicular ao plano do papel, enquanto o outro eixo é vertical e horizontal ao plano do papel (Valentini *et al*, 2002)

A existência de vários domínios na piruvato cinase é essencial para a regulação da actividade deste enzima. Esta regulação é feita através da ligação de um ou mais efectores que fazem o enzima alternar entre os diferentes estados conformacionais. A alternância entre um estado apertado de baixa afinidade (enzima inactivo) para um estado relaxado de alta afinidade (enzima activo) ocorre através da combinação entre rotações na subunidade e no domínio juntamente com alterações na conformação do sítio activo. Os resíduos localizados no sítio activo e a interface entre as subunidades desempenham um papel fundamental na comunicação entre o local de ligação do activador (localizado no domínio C) e o centro catalítico (localizado nos domínios A e B) (Valentini *et al*, 2002; Zanella *et al*, 2005; Zanella *et al*, 2007).

Nos mamíferos, a piruvato cinase é codificada por dois genes: o gene PKM e o gene PKLR. O gene PKM localiza-se no cromossoma 15 (15q22) e codifica os isoenzimas M₁ (muscular – predominante na musculatura, coração e cérebro) e M₂

(fetal) através de *splicing* alternativo do mesmo RNA. O isoenzima M₂ encontra-se presente nos tecidos fetais, sendo substituído progressivamente ao longo do desenvolvimento por outras isoformas específicas de cada tecido, no entanto mantém-se como isoforma dominante nos rins, leucócitos, plaquetas, pulmões, baço e tecido adiposo. Este isoenzima é também expresso num grande número de tumores, onde substitui o isoenzima específico do tecido. O isoenzima M₂ apresenta resposta cinética sigmoidal ao PEP, é alostericamente activado pela FBP e negativamente regulado pela ATP, enquanto o isoenzima M₁ não apresenta propriedades cooperativas (Valentini *et al*, 2002; Zanella *et al*, 2005; Zanella *et al*, 2007). O gene PKLR localiza-se no cromossoma 1 (1q21), tem mais de 9.5 kb e codifica a isoenzima PKL (encontra-se no fígado, no córtex renal e no intestino delgado) e a isoenzima PKR (exclusiva dos glóbulos vermelhos). A alternância entre a codificação dos dois tipos de isoenzima ocorre através do recurso a promotores alternativos específicos do tecido em causa. A região codificante do gene é composta por doze exões, dez dos quais são partilhados pelos dois isoenzimas, enquanto o exão 1 e 2 são específicos dos isoenzimas PKR e PKL, respectivamente. Tal como o isoenzima M₂, os isoenzimas PKL e PKR apresentam resposta cinética sigmoidal ao PEP, são alostericamente activados pela FBP e negativamente regulados pela ATP. O cDNA que codifica o isoenzima PKR tem 2060 bp e codifica 574 aminoácidos. O promotor do isoenzima PKR no gene PKLR localiza-se na região 5' antes do primeiro exão e já foram identificadas duas caixas CAC e quatro motivos GATA nos 270 bp até ao codão de iniciação. Os 120 bp mais próximos ao codão de iniciação têm actividade promotora basal, enquanto que os 120-270 bp actuam como um *enhancer* poderoso nos eritrócitos (Valentini *et al*, 2002; Zanella *et al*, 2005; Zanella *et al*, 2007).

A PKR é uma proteína bastante estável capaz de durar durante toda a vida do eritrócito. Contrariamente a outras piruvato cinases este enzima é protegido da inactivação pelo calor pela FBP. Este enzima é um tetrâmero composto por duas subunidades de 62 kDa e outras duas subunidades de 58 kDa, as duas subunidades mais leves geram-se devido ao corte proteolítico da cadeia N-terminal. O papel desempenhado pela extensão N-terminal e a estrutura real dos dois tipos de subunidades deste enzima ainda estão por descobrir (Zanella *et al*, 2005; Zanella *et al*, 2007).

A produção de ATP nos eritrócitos depende exclusivamente da glicólise, como tal a piruvato cinase desempenha um papel fundamental no metabolismo dos eritrócitos,

pois catalisa um dos dois passos de produção de ATP nos glóbulos vermelhos. Como tal a diminuição da actividade da piruvato cinase tem grandes consequências nas funções celulares e na esperança de vida celular, uma vez que reduz a quantidade de energia produzida podendo levar à depleção do ATP e consequentemente à hemólise. Para além disso a deficiência na piruvato cinase leva à acumulação dos intermediários glicolíticos próximos ao bloqueio metabólico, em especial o 2,3-DPG que pode aumentar até três vezes e assim dificultar ainda mais o fluxo glicolítico, através da inibição da hexocinase (Valentini *et al*, 2002; Zanella *et al*, 2005; Zanella *et al*, 2007; Berghout *et al*, 2012).

Como já se referiu, a piruvato cinase é extremamente importante para o bom funcionamento celular mas no entanto é a segunda causa mais comum de anemia hemolítica não esferocítica hereditária em humanos (Berghout *et al*, 2012). Já foram encontradas pelo menos 180 mutações associadas à anemia hemolítica não esferocítica e 8 sítios polimórficos no gene PKLR (Zanella *et al*, 2007). As mutações identificadas são principalmente *missense* (69%), de *splicing* (13%) e *nonsense* (5%); no entanto pequenas deleções, inserções e mutações de *frameshift* também ocorrem, apesar de serem raras. Foram encontradas apenas duas mutações na região do promotor do gene (-72A→G e -83G→C) e foram funcionalmente caracterizadas: a -72A→G causa a disrupção GATA-1 e a -83G→C altera o elemento regulatório PKR-RE1. Foram encontradas algumas grandes deleções no gene PKLR: a “Gypsy” que é uma deleção de 1149bp e leva à perda do exão 11, a PK “Viet” que é uma deleção de 5006bp e gera um cDNA sem os exões 4 a 11. As três mutações mais frequentes em doentes com piruvato cinase deficiente são a 1529A, a 1456T e a 1468T, estando associadas a um *background* étnico e regional específico. A mutação 1529A é comum nos EUA (42%) e no Norte e Centro da Europa (41%), enquanto a mutação 1456T é prevalente no Sul da Europa (32% em Espanha, 35% em Portugal e 29% em Itália), onde a mutação 1529A é rara. A mutação 1468T ocorre com maior frequência na Ásia (9/16 famílias não relacionadas). Apenas duas mutações (1151T e 1436A) são comuns às populações japonesas e caucasianas. Outras mutações, em especial a 721T e a 994A, estão presentes em baixa frequência em populações caucasianas (Zanella *et al*, 2005; Zanella *et al*, 2007). Apesar de pouco se saber sobre a prevalência da deficiência da piruvato cinase em África, sabe-se que a mutação 1456T é encontrada em afroamericanos e que a mutação 1614T foi identificada em São Tomé e Príncipe com baixa frequência. Recentemente três mutações (277 Glu→Lys, 295 Ala→Ile e 507 His→His) foram

identificadas em populações da África Subsaariana (Berghout *et al*, 2012; Manco & Ribeiro, 2009; Beutler & Gelbart, 2000a).

A deficiência na piruvato cinase encontra-se distribuída mundialmente, mas estabelecer a prevalência actual da doença tem vindo a ser bastante difícil e confuso, devido às metodologias aplicadas (Carey *et al*, 2000). A prevalência da doença estimada com base no número de pacientes afectados tende a ser substancialmente inferior à estimativa efectuada com base na prevalência dos heterozigóticos na população, uma vez que a mortalidade pré-natal e neonatal diminui a frequência da doença na população em geral (Beutler & Gelbart, 2000b). A prevalência da doença estimada através de estudos da frequência do gene na população branca é de 1:20.000 (Beutler & Gelbart, 2000a) e a estimada na Ásia através de da medição da actividade do PK é de 0,1% a 3,12% (Abu-Melha *et al*, 2001; Feng *et al*, 1993; Yavarian *et al*, 2008). A prevalência da doença em África ainda é pouco estudada, no entanto sabe-se que a frequência dos heterozigóticos é cerca de 1% a 2% nas populações da maioria dos estudos, variando entre cerca de 0,2% e 6% (Beutler & Gelbart, 2000a, Yavarian *et al*, 2008; Berghout *et al*, 2012).

As anomalias no gene PKLR podem gerar alterações, quer no enzima PKR, quer no PKL, no entanto as manifestações clínicas encontram-se apenas associadas ao PKR, uma vez que a deficiência hepática é geralmente compensada pela persistência da síntese da enzima nos hepatócitos. Nos eritrócitos isto não acontece, pois como as células são enucleadas não se sintetiza nova proteína. As manifestações clínicas da deficiência na piruvato cinase passam por uma hemólise vitalícia que gera anemia. O grau de severidade da anemia é variável, indo desde o muito suave ou anemia totalmente compensada (detectável apenas na idade adulta) até anemia neonatal fatal e icterícia, o que leva à necessidade de transfusões de sangue e subsequente terapia contínua de transfusão. Em casos mais raros ocorre também hidropsia fetal e morte durante o período neonatal. Nas crianças, a anemia tende a melhorar com a idade, podendo mesmo desaparecer em alguns casos. Nos adultos, o grau de anemia é relativamente constante, podendo aumentar ocasionalmente em casos de infecções agudas ou durante a gravidez. A gravidez é geralmente bem tolerada por pacientes com esta doença e associada a um resultado perinatal favorável, ainda assim a hemólise pode aumentar, requerendo transfusões de sangue antes e depois do parto. Outros sintomas associados à doença são esplenomegalia e esplenectomia (que levam a estabilização da

hemoglobina a níveis ligeiramente mais elevados), colecistectomia, crises aplásticas, reticulocitose, kernicterus, úlceras crónicas nas pernas, pancreatite aguda, abscesso esplénico, compressão da corda espinal, eventos tromboembólicos e excesso de ferro (Zanella *et al*, 2005; Zanella *et al*, 2007).

Como a maioria das características hematológicas da deficiência da piruvato cinase não são distinguíveis das características das outras anemias hemolíticas, o diagnóstico tem de ser feito com base na determinação da actividade enzimática (embora alguns pacientes possam ter actividade enzimática normal ou até aumentada) e no teste do DNA (Zanella *et al*, 2005; Zanella *et al*, 2007). A maioria dos doentes anémicos homozigóticos ou heterozigóticos compostos apresentam um piruvato cinase com actividade enzimática de apenas 5% a 40% da actividade enzimática normal do enzima (Zanella & Bianchi, 2000).

Não é possível estabelecer uma relação entre a actividade da piruvato cinase e a severidade da hemólise ou o número de reticulócitos, uma vez que pacientes com genótipos idênticos podem ser afectados de forma totalmente diferente, mesmo quando são da mesma família. A variação na expressão clínica pode estar relacionada com possíveis diferenças metabólicas individuais ou na actividade proteolítica que podem modular diversamente o efeito da actividade basal da mutação e na capacidade de compensação da deficiência do enzima através da sobreexpressão dos isoenzimas ou através do uso de vias alternativas. A persistência compensatória do isoenzima M₂ em eritrócitos maduros já foi descrita em alguns doentes severamente afectados (Zanella *et al*, 2005; Zanella *et al*, 2007).

A deficiência na piruvato cinase já foi associada com uma possível resistência à malária. A primeira associação foi estabelecida com recurso a um modelo experimental murino por Min-Oo *et al*. que observou que duas estirpes de ratos congénitos recombinantes eram protegidas contra a infecção por *Plasmodium chabaudi* e foi identificada a mutação 269T→A (90Ile→Asn) no gene PKLR como sendo a mutação responsável por esta protecção. Esta mutação foi relacionada com a protecção devido ao facto de os homozigóticos 269T→A apresentarem uma diminuição na parasitémia e uma maior sobrevivência à infecção (Min-Oo *et al*, 2003). A mutação 269T→A também já foi descrita em humanos com deficiência na piruvato cinase, mas sem estudo de associação à malária (Van Solinge *et al*, 1997). Min-Oo e os seus colaboradores

continuaram a analisar a expressão fenotípica do alelo 269A e a correlação entre a sua actividade enzimática, a extensão da anemia hemolítica e a protecção do alelo contra a malária, em modelos experimentais murinos. Identificaram também uma segunda mutação 338Gly→Asp que apresenta um fenótipo mais severo, o que permitiu concluir que o grau de protecção está associado com o grau de deficiência da piruvato cinase. Foi também sugerido que o aumento da fagocitose de eritrócitos não infectados e infectados com *P. chabaudi* pode contribuir decisivamente para a redução da parasitémia e levar ao aumento da resistência à infecção (Min-Oo *et al*, 2004; Min-Oo & Gros, 2005; Min-Oo *et al*, 2007).

Através da realização de estudos *in vitro* foi possível comparar o crescimento de *P. falciparum* em eritrócitos normais com o crescimento em eritrócitos com piruvato cinase deficiente, em humanos, tendo-se observado que nos eritrócitos homozigóticos para a deficiência, há uma redução significativa do desenvolvimento parasitário durante três ciclos de crescimento sucessivos e nos heterozigóticos não ocorrem efeitos significativos. Na análise da maturação intracelular do parasita não foram encontradas diferenças entre eritrócitos de homozigóticos e heterozigóticos para a deficiência e os eritrócitos controlo. Foi também detectado que os eritrócitos parasitados (deficientes e controlos) eram mais fagocitados (Ayi *et al*, 2012; Durand & Coetzer; 2008).

Ainda não são conhecidos os mecanismos que fazem com que a piruvato cinase afecte a capacidade de replicação do *Plasmodium* dentro dos eritrócitos, mas pode envolver uma das seguintes possibilidades: a membrana torna-se mais rígida (devido à depleção do ATP nas células que leva à perda de grandes quantidades de água e potássio, gerando desidratação e rigidez) afectando assim a invasão por parte do parasita; a alteração das propriedades da membrana resulta num encurtamento da semivida dos eritrócitos infectados e não infectados, devido ao aumento da fagocitose; o aumento dos metabólitos intermédios, como a 2,3-DPG e espécies oxidativas, gera um ambiente intracelular menos favorável; a alteração no rácio de reticulócitos a amadurecer nos eritrócitos em circulação, afecta a replicação do *Plasmodium* que prefere eritrócitos maduros como hospedeiros; e a diminuição do metabolismo da glucose por parte do hospedeiro dentro do eritrócito (Zanella & Bianchi, 2000; Min-Oo *et al*, 2003).

A partir da análise dos níveis de ATP em eritrócitos com deficiência na piruvato cinase foi possível observar uma correlação entre os níveis de ATP e, quer a inibição da invasão parasitária, quer do aumento da fagocitose dos eritrócitos infectados. Os parasitas que invadem eritrócitos com piruvato cinase deficiente respondem a baixos níveis de ATP dentro do eritrócito, através do aumento paralelo do ATP produzido pelo parasita com recurso à sobre-regulação da piruvato cinase específica do *Plasmodium falciparum*. Com base nestes e noutros resultados foi sugerido por Ayi *et al.* que a protecção contra a malária estaria associada à redução na produção de ATP conjuntamente com o aumento do 2,3-DPG, o que contribui para a manutenção do GSH em baixa quantidade, levando assim a que se possam formar quantidades excessivas de radicais livres que transformam a oxi-hemoglobina em meta-hemoglobina e em última instância gerarem hemocromas, contribuindo para a destabilização mecânica da membrana dos eritrócitos com piruvato cinase deficiente e disrompendo o citoesqueleto proteico da membrana celular, através da agregação da banda 3 do complexo espectrina-actina e consequentemente diminuindo a invasão do parasita (Ayi *et al.*, 2009).

3. Mutação G829A (Glu277Lys)

A mutação G829A é uma mutação *missense* que se encontra no par de bases 829 após o nucleótido A do codão de iniciação ATG e se localiza no exão 7. Simulações realizadas à substituição Glu277Lys na proteína da piruvato cinase sugerem que esta mutação é provavelmente não funcional. A perda de função da proteína deve-se possivelmente à alteração da carga num sítio exposto (uma vez que o Glu é negativamente carregado e a Lys é positivamente carregada), modificando assim a acção do enzima (Machado *et al.*, 2012).

Esta substituição aminoacídica foi identificada inicialmente em dois indivíduos, um do grupo étnico Mandenka (grupo étnico do Oeste Africano) e outro do grupo étnico Brahui do Paquistão (Berghout *et al.*, 2012). Posteriormente, num estudo feito na África Subsaariana a mutação foi encontrada em diversos países: Moçambique apresentou uma frequência de heterozigóticos de 7,1% (a que corresponde uma frequência alélica de 3,7%), Angola onde se observou uma frequência de heterozigóticos de 6,7% (que equivale a uma frequência alélica de 3,4%), Guiné Equatorial registou uma frequência

de heterozigóticos de 2,6% (a que corresponde uma frequência alélica de 1,3%) e São Tomé e Príncipe onde se encontrou uma frequência de heterozigóticos de 3,0% (que equivale a uma frequência alélica de 1,5%). Em Moçambique foi também possível observar que 41,7% dos deficientes para a piruvato cinase que apresentavam redução da actividade enzimática apresentavam a mutação G829A (Machado *et al*, 2012).

II. Objectivos do estudo

O efeito protector da piruvato cinase relativamente à malária em humanos ainda não está estabelecido, uma vez que até hoje os únicos dados que foram obtidos em humanos parecem mostrar uma redução da infecção por malária em indivíduos com piruvato cinase deficiente (apenas 11 indivíduos), no entanto é também possível observar um indivíduo com deficiência na piruvato cinase e que tem malária severa. Os dados mais consistentes que suportam a teoria do efeito protector da piruvato cinase foram obtidos em modelo experimental murino (onde se encontrou uma associação significativa entre a deficiência na piruvato cinase e a diminuição da parasitémia e o aumento da sobrevivência à malária) e através de estudos *in vitro* usando eritrócitos humanos deficientes para a piruvato cinase (onde se observou uma redução significativa na invasão dos eritrócitos pelos parasitas em eritrócitos homozigóticos para a deficiência na piruvato cinase e o aumento da fagocitose dos eritrócitos parasitados). Estão claramente em falta dados na população humana que permitam identificar uma variante de piruvato cinase deficiente altamente prevalente nas regiões onde a malária é endémica e permitam encontrar assinaturas de selecção na região do genoma onde se encontra o gene PKLR. É também muito escassa a informação proteómica sobre a infecção pelo *Plasmodium*, faltando dados sobre: o proteoma dos eritrócitos normais infectados com o *Plasmodium*, o proteoma dos eritrócitos com piruvato cinase deficientes infectados e não infectados pelo *Plasmodium* e o proteoma do próprio parasita quando se desenvolve em eritrócitos piruvato cinase deficientes. Estes dados proteómicos darão informações fundamentais para o entendimento da dinâmica da infecção e os mecanismos associados à protecção contra a malária.

O objectivo principal desta tese não é resolver todos estes problemas e preencher todas as lacunas de informação aqui relatadas, mas sim acrescentar mais alguns dados que possam vir a dar mais alguma luz sobre uma possível associação entre a deficiência na piruvato cinase e a protecção relativamente à malária nos humanos. De forma geral, esta dissertação pretende contribuir para o conhecimento dos factores genéticos associados com a protecção à malária em humanos, e para a identificação de mecanismos protectivos que possam ser utilizados como fonte de conhecimento para o desenvolvimento de terapêuticas. Este trabalho intenta também acrescentar mais

algumas informações aos conhecimentos gerais das deficiências enzimáticas eritrócitárias.

III. Materiais e Métodos

1. Grupos de estudo

Entre Janeiro de 2013 e Maio de 2013 foram recolhidas amostras sanguíneas e realizados esfregaços bucais em 81 pacientes de 4 unidades hospitalares da Guiné-Bissau: 15 na Agência de Saúde Básica de Madina, 15 na Agência de Saúde Básica de Caiquéne, 40 no Hospital Materno-Infantil de Iemberém e 11 na Agência de Saúde Básica de Indena (Tabela 2).

Tabela 2: Número de indivíduos por sexo e unidade hospitalar

	Homens	Mulheres	Total
Agência de Saúde Básica de Madina	5	10	15
Agência de Saúde Básica de Caiquéne	4	11	15
Hospital Materno-Infantil de Iemberém	12	28	40
Agência de Saúde Básica de Indena	4	7	11
Total	25	56	81

Os resultados que foram obtidos no grupo de amostras da Guiné-Bissau foram comparados com os resultados obtidos os grupos de Moçambique (composto por 447 amostras), de Angola (composto por 164 amostras), da Guiné Equatorial (composto por 38 amostras) e de São Tomé e Príncipe (composto por 167 amostras) como o objectivo de avaliar se a população da Guiné-Bissau tem uma incidência da mutação semelhante a outros países onde a malária é endémica. As amostras da Guiné-Bissau foram ainda comparadas com amostras de Portugal (74 amostras) que serviram de contraposição, uma vez que Portugal é um país onde a malária se encontra erradicada há muitos anos.

Todos os resultados dos grupos comparativos foram gentilmente cedidos pela Dr.^a Ana Paula Arez.

Foram excluídas 15 das 81 amostras da Guiné-Bissau, uma vez que devido às condições de acondicionamento das amostras estas se encontravam mais degradadas o que impossibilitou a amplificação das mesmas.

Toda a informação que foi considerada relevante como sexo, idade, ascendência étnica, hábitos de protecção contra o mosquito, etc., foi fornecida pelos indivíduos participantes no estudo através da realização de um inquérito (ver anexo 1). Todos os participantes assinaram uma declaração de consentimento informado para que os seus dados e a análise de genes pudessem ser utilizados (ver anexo 2, 3 e 4).

2. Recolha de amostras

As amostras de sangue foram recolhidas por punção digital, tendo-se obtido de cada indivíduo, sangue para dois tubos (cerca de 20-30µL de sangue para cada tubo) e para papel de filtro (devido a limitações de material nem todas as amostras foram possíveis de ser recolhidas em papel de filtro). O sangue retirado para os tubos foi conservado por dois métodos distintos: a amostra de um dos tubos foi conservada recorrendo a etanol e a do outro tubo foi conservada recorrendo a *RNAlater*. Os esfregaços bucais foram realizados esfregando a zaragatoa duas vezes em cada lado da boca dos pacientes. Foi realizado para todos os indivíduos o teste rápido para a malária.

Como as amostras foram recolhidas na Guiné-Bissau em locais com poucas condições de conservação apenas, estiveram refrigeradas enquanto se encontraram dentro das unidades hospitalares. Assim, estas em condições de conservação não ideais levaram muito provavelmente à degradação do DNA, o que veio a trazer algumas complicações a nível da amplificação da mutação em estudo.

Todos os procedimentos experimentais que se seguem foram realizados no Laboratório do Departamento de Promoção da Saúde e Prevenção de Doenças Não Transmissíveis do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, sob a alçada da Investigadora Isabel Picanço, e no Laboratório de Biologia Evolutiva e Genética do Departamento de Biologia Animal da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa.

3. Extracção do DNA

O DNA genómico de cada indivíduo foi extraído ou a partir dos leucócitos presentes nas amostras sanguíneas ou a partir das células do epitélio bucal contidas nos esfregaços bucais, com recurso ao kit *QIAmp DNA Mini Kit* da Qiagen (Netherlands) e seguindo 3 protocolos diferentes, de acordo com o tipo de amostra e o método de conservação.

As amostras de sangue conservadas em papel de filtro foram extraídas de acordo com o seguinte protocolo:

1. Colocaram-se 2 círculos de 4,25mm do papel de filtro com sangue seco num tubo de microcentrifuga de 1,5mL e adicionou-se 180µL de *Buffer* ATL.
2. Incubou-se a 85°C por 10min. Efectuou-se uma rápida centrifugação para evitar gotas na parede do tubo.
3. Adicionou-se 20µL de proteinase K. Misturou-se bem com o auxílio de um vortex e incubou-se a 56°C por 1h. Efectuou-se uma rápida centrifugação para evitar gotas na parede do tubo.
4. Adicionou-se 200µL de *Buffer* AL à amostra. Misturou-se muito bem com recurso a um vortex, e incubou-se a 70°C por 10 min. Efectuou-se uma rápida centrifugação para evitar gotas na parede do tubo.
5. Adicionou-se 200µL de etanol (96-100%) à amostra e misturou-se muito bem com a ajuda de um vortex. Efectuou-se uma rápida centrifugação para evitar gotas na parede do tubo.
6. Aplicou-se cuidadosamente a mistura numa coluna *QIAmp Mini spin* (que se encontra num tubo receptor de 2mL). Centrifugou-se a 8.000rpm durante 1min.
7. Colocou-se a coluna *QIAmp Mini spin* num tubo receptor de 2mL novo e descartou-se o tubo contendo o filtrado. Adicionou-se 500µL do *Buffer* AW1. Centrifugou-se a 8.000rpm durante 1min.
8. Colocou-se a coluna *QIAmp Mini spin* num tubo receptor de 2mL novo e descartou-se o tubo contendo o filtrado. Adicionou-se 500µL do *Buffer* AW2. Centrifugou-se a 13.200rpm por 4 min.

9. Colocou-se a coluna *QIAmp Mini spin* num tubo receptor de 2mL novo e descartou-se o tubo contendo o filtrado. Centrifugou-se a 13.200rpm por 1 min.
10. Colocou-se a coluna *QIAmp Mini spin* num tubo de microcentrífuga de 1,5mL novo e descartou-se o tubo contendo o filtrado. Adicionou-se 80µL do *Buffer AE*. Deixou-se a incubar à temperatura ambiente *overnight* e centrifugou-se a 8.000rpm por 1 min.

As amostras de sangue conservadas em etanol e RNAlater foram extraídas de acordo com o seguinte protocolo:

1. Centrifugou-se os tubos com a amostra conservada em etanol ou em RNAlater a 13.200rpm por 10min.
2. Retirou-se o sobrenadante e descartou-se o mesmo.
3. Ressuspendeu-se o sangue que se encontrava no fundo dos tubos em 200µL de PBS.
4. Pipetou-se 20µL de proteinase K para um tubo de microcentrífuga de 1,5mL.
5. Adicionou-se a amostra ressuspendida no PBS ao tubo de 1,5mL e adicionou-se também 4µL RNase.
6. Adicionou-se 200µL de *Buffer AL* à amostra. Misturou-se muito bem com o auxílio de um vortex por pelo menos 15seg.
7. Incubou-se a 56°C por 10min. Efectuou-se uma rápida centrifugação para evitar gotas na parede do tubo.
8. Adicionou-se 200µL de etanol (96-100%), e misturou-se muito bem com recurso a um vortex por pelo menos 15seg. Efectuou-se uma rápida centrifugação para evitar gotas na parede do tubo.
9. Aplicou-se cuidadosamente a mistura numa coluna *QIAmp Mini Spin* (que se encontra num tubo receptor de 2mL). Centrifugou-se a 8.000rpm por 1min.
10. Colocou-se a coluna *QIAmp Mini spin* num tubo receptor de 2mL novo e descartou-se o tubo contendo o filtrado. Adicionou-se 500µL do *Buffer AW1*. Centrifugou-se a 8.000rpm por 1 min.
11. Colocou-se a coluna *QIAmp Mini spin* num tubo receptor de 2mL novo e descartou-se o tubo contendo o filtrado. Adicionou-se 500µL do *Buffer AW2*. Centrifugou-se a 13.200rpm por 4 min.

12. Colocou-se a coluna *QIAmp Mini spin* num tubo receptor de 2mL novo e descartou-se o tubo contendo o filtrado. Centrifugou-se a 13.200rpm por 1 min.
13. Colocou-se a coluna *QIAmp Mini spin* num tubo de microcentrífuga de 1,5mL novo e descartou-se o tubo contendo o filtrado. Adicionou-se 80µL do *Buffer AE*. Deixou-se a incubar à temperatura ambiente *overnight* e centrifugou-se a 8.000rpm por 1 min.

Os esfregaços bucais foram extraídos de acordo com o seguinte protocolo:

1. Cortou-se a extremidade do esfregaço bucal contendo o algodão para dentro de um tubo de microcentrífuga de 1,5mL. Adicionou-se 400µL de PBS à amostra e adicionou-se também 4µL RNase.
2. Adicionou-se 20µL de proteinase K e 400µL de *Buffer AL* à amostra. Misturou-se muito bem com o auxílio de um vortex por pelo menos 15seg.
3. Incubou-se a 56°C por 10 min. Efectuou-se uma rápida centrifugação para evitar gotas na parede do tubo.
4. Adicionou-se 400µL de etanol (96-100%) à amostra e misturou-se bem com recurso a um vortex. Efectuou-se uma rápida centrifugação para evitar gotas na parede do tubo.
5. Aplicou-se cuidadosamente 700µL da mistura numa coluna *QIAmp Mini Spin* (que se encontra num tubo receptor de 2 mL). Centrifugou-se a 8.000rpm por 1min.
6. Colocou-se a coluna *QIAmp Mini spin* num tubo receptor de 2mL novo e descartou-se o tubo contendo o filtrado. Aplicou-se o resto da mistura na coluna *QIAmp Mini spin*. Centrifugou-se a 8.000rpm por 1 min.
7. Colocou-se a coluna *QIAmp Mini spin* num tubo receptor de 2mL novo e descartou-se o tubo contendo o filtrado. Adicionou-se 500µL do *Buffer AW1*. Centrifugou-se a 8.000rpm por 1 min.
8. Colocou-se a coluna *QIAmp Mini spin* num tubo receptor de 2mL novo e descartou-se o tubo contendo o filtrado. Adicionou-se 500µL do *Buffer AW2*. Centrifugou-se a 13.200rpm por 4 min.
9. Colocou-se a coluna *QIAmp Mini spin* num tubo receptor de 2mL novo e descartou-se o tubo contendo o filtrado. Centrifugou-se a 13.200rpm por 1 min.

10. Colocou-se a coluna *QIAmp Mini spin* num tubo de microcentrífuga de 1,5mL novo e descartou-se o tubo contendo o filtrado. Adicionou-se 80µL do *Buffer AE*. Deixou-se a incubar à temperatura ambiente *overnight* e centrifugou-se a 8.000rpm por 1 min.

Após a extracção todas as amostras foram quantificadas por espectrofotometria no *NanoDrop (Thermo Scientific)* para avaliar a concentração de DNA presente em cada amostra.

4. Selecção dos *primers*

Os *primers* seleccionados para fazer a amplificação do exão 7 do gene do PKLR, onde se encontra a mutação G829A foram os mesmos *primers* que já tinham sido utilizados por Machado, *et al.* (Machado *et al.*, 2012), para amplificar o mesmo exão.

- *Primer forward – 7D – ACCGCAGCTGGCTCTTTC*
- *Primer Reverse – 7R – GTGATGGGGAATAGCGACAG*

A produção de todos os *primers* foi encomendada à empresa STAB VIDA (Costa da Caparica, Portugal).

5. Amplificação do exão

O exão foi amplificado através de reacções de polimerização em cadeia (PCR) utilizando *primers* específicos (Figura 5).

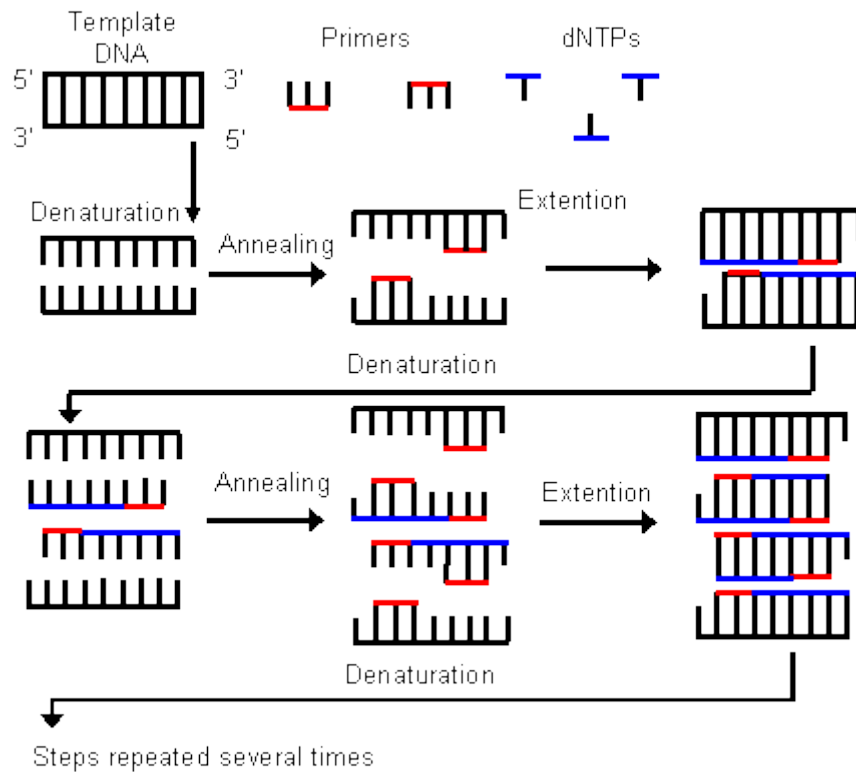


Figura 5: Representação da reacção de polimerização em cadeia
http://wiki.biomine.skelleftea.se/wiki/images/c/c6/Steps_in_PCR.gif (consultado dia16-09-2013)

Devido à reduzida quantidade de amostra recolhida e às fracas condições de acondicionamento, as amostras encontravam-se degradadas o que impossibilitou a optimização do PCR, como tal tiveram de ser utilizadas diversas misturas de reacção e vários ciclos térmicos, para cada amostra até ser possível a amplificação de cada uma delas.

Os vários modelos de misturas de reacção utilizados encontram-se explicitados na Tabela 3.

Tabela 3: Quantidade de cada um dos componentes utilizados em cada um dos modelos de mistura de reacção

Componente	Modelo 1		Modelo 2		Modelo 3		Modelo 4	
	Vol. (µL)	Concentração	Vol. (µL)	Concentração	Vol. (µL)	Concentração	Vol. (µL)	Concentração
Água	25,8		22,9		20,9		13,9	
Tampão	10	1 x	10	1 x	10	1 x	10	1 x
MgCl ₂	6	3 mM	6	3 mM	6	3 mM	8	4 mM
dNTP's	4	0,2 mM	4	0,2 mM	4	0,2 mM	4	0,2 mM
BSA	-	-	1,6	0,32 mM	1,6	0,32 mM	1,6	0,32 mM
Primer Fwr	1	2 ng/µL	1	2 ng/µL	1	2 ng/µL	1	2 ng/µL
Primer Rv	1	2 ng/µL	1	2 ng/µL	1	2 ng/µL	1	2 ng/µL
Taq	0,2	0,02 U/µL	0,5	0,05 U/µL	0,5	0,05 U/µL	0,5	0,05 U/µL
Total Mistura de Reacção	48	-	47	-	45	-	40	-
DNA	2	variável	3	variável	5	variável	10	variável
Total Reacção	50	-	50	-	50	-	50	-

A enzima polimerase de DNA utilizada foi a *GoTaq Flexi*, da Promega (Madison, USA).

A reacção de amplificação foi executada num termociclador *GeneAmp PCR System 2700*, da Applied Biosystems (Foster City, USA). Tal como nas misturas de reacção não foi possível utilizar apenas um único ciclo térmico. Os ciclos térmicos utilizados foram os seguintes:

- **Ciclo 1** – começou-se com um período inicial de desnaturaçãõ de 1 minuto a 94°C, seguido de 32 ciclos compostos por um período de 45 segundos a 94°C, 45 segundos a 65°C e 45 segundos a 72°C, finalmente realizou-se um período de extensão de 5 minutos a 72°C. Para a realização do ciclo 1 utilizou-se a mistura de reacção modelo 1.
- **Ciclo 2** – começou-se com um período inicial de desnaturaçãõ de 1 minuto a 94°C, seguido de 35 ciclos compostos por um período de 45 segundos a 94°C, 45 segundos a 65°C e 45 segundos a 72°C, finalmente realizou-se um período de extensão de 5 minutos a 72°C. O ciclo 2 foi realizado utilizando as misturas de reacção modelo 2, modelo 3 e modelo 4.
- **Ciclo 3** – começou-se com um período inicial de desnaturaçãõ de 1 minuto a 94°C, seguido de 35 ciclos compostos por um período de 45 segundos a 94°C, 45 segundos a 62°C e 45 segundos a 72°C, finalmente realizou-se um período

de extensão de 5 minutos a 72°C. Para a realização do ciclo 1 utilizou-se a mistura de reacção modelo 3.

- **Ciclo 4** – começou-se com um período inicial de desnaturação de 1 minuto a 94°C, seguido de 35 ciclos compostos por um período de 45 segundos a 94°C, 45 segundos a 60°C e 45 segundos a 72°C, finalmente realizou-se um período de extensão de 5 minutos a 72°C. Para a realização do ciclo 1 utilizou-se a mistura de reacção modelo 3.
- **Ciclo 5** – começou-se com um período inicial de desnaturação de 1 minuto a 94°C, seguido de 35 ciclos compostos por um período de 45 segundos a 94°C, 45 segundos a 57°C e 45 segundos a 72°C, finalmente realizou-se um período de extensão de 5 minutos a 72°C. Para a realização do ciclo 1 utilizou-se a mistura de reacção modelo 3.
- **Ciclo 6** – começou-se com um período inicial de desnaturação de 1 minuto a 94°C, seguido de 35 ciclos compostos por um período de 45 segundos a 94°C, 45 segundos a 55°C e 45 segundos a 72°C, finalmente realizou-se um período de extensão de 5 minutos a 72°C. Para a realização do ciclo 1 utilizou-se a mistura de reacção modelo 3.

Os resultados obtidos foram confirmados por electroforese em gel de agarose a 2% corado com *Redsafe* (20.000x). As bandas dos géis foram visualizadas e fotografadas por exposição à luz ultravioleta, sendo o tamanho destas calculado por comparação com o marcador molecular *Gene Ruler* da *Fermentas*. A figura 6 apresenta um dos géis obtidos.

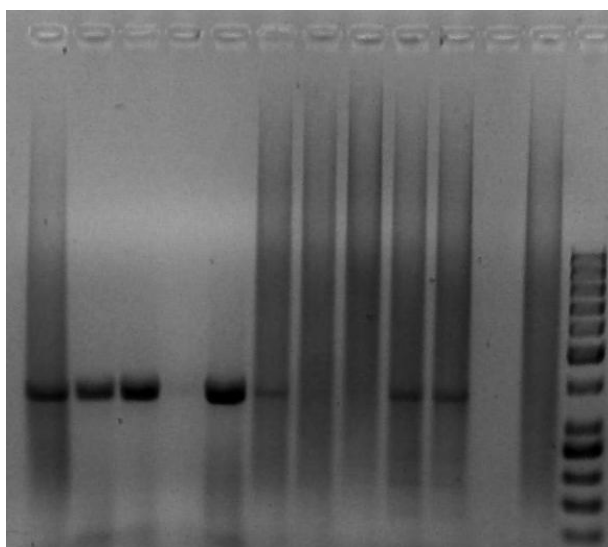


Figura 6: Fotografia de uma electroforese em gel de agarose do exão 7 do gene PKLR (350bp)

6. Sequenciação do exão

Antes de se poder proceder à sequenciação das amostras é necessário realizar a purificação das mesmas. Como tal, todas as amostras em que foi possível observar uma banda na zona dos 350bp foram purificadas de acordo com o seguinte protocolo:

1. Dividiu-se os 40 μ L de produto de PCR para dois tubos de microcentrífuga, 20 μ L para cada tubo.
2. Adicionou-se 20 μ L de *SureClean* da Bioline (Tauton, USA) a cada tubo.
3. Misturou-se bem com o auxílio de um vortex por 30 min.
4. Centrifugou-se a 14.680 rpm por 25 min.
5. Retirou-se o sobrenadante sem perturbar o *pellet*.
6. Adicionou-se 40 μ L de etanol a 70% a cada tubo.
7. Centrifugou-se a 14.680 rpm por 15 min.
8. Retirou-se o sobrenadante sem perturbar o *pellet*.
9. Deixou-se as amostras a secar para evaporar bem o etanol.
10. Eluiu-se as amostras em 17 μ L de ddH₂O

As amostras depois de purificadas foram encaminhadas para a *Beckman Coulter Genomics* (Essex, Reino Unido) para sequenciar.

Para a análise dos resultados da sequenciação assim como para a obtenção das alterações polimórficas utilizou-se o programa *Sequencher* 4.05 (1999) da *Gene Codes Corporation*.

7. Análise Estatística

A frequência do polimorfismo foi testada em relação à conformidade com o equilíbrio de Hardy-Weinberg, no sentido de se avaliar a qualidade da amostragem. Esta análise foi feita de acordo com a cadeia de Markov.

A fim de se comparar a distância genética entre diversas populações africanas de áreas onde a malária é endémica calculou-se o F_{ST} entre a população da Guiné-Bissau e as populações controlo.

Foi também calculada a frequência alélica e a frequência do heterozigótico para se obter uma ideia da incidência da mutação na população Guineense.

Toda a análise estatística foi efectuada recorrendo ao *software* Arlequin 3.5.1.3 (*Computational and Molecular Population Genetics Lab, University of Bern*).

IV. Resultados

1. Quantificação do DNA

A Tabela 4 apresenta os resultados da quantificação do DNA das amostras extraído pelos vários métodos.

Tabela 4: Quantificação do DNA em ng/ μ L por espectrofotometria no nanodrop

Amostra^a	ng/ul	A260	A280	260/280	260/230
1 FTA	30,00	0,600	0,412	1,46	0,67
2 FTA	7,98	0,160	0,118	1,35	1,10
3 Etanol	14,64	0,293	0,199	1,47	0,90
4 FTA	5,45	0,109	0,084	1,29	1,18
5 FTA	9,13	0,183	0,118	1,55	1,05
6 FTA	21,16	0,423	0,299	1,42	0,62
7 FTA	6,09	0,122	0,090	1,36	1,42
7 Etanol	9,46	0,189	0,146	1,29	2,55
8 FTA	2,51	0,050	0,045	1,11	2,66
8 Etanol	14,44	0,289	0,209	1,38	1,35
9 FTA	2,57	0,051	0,042	1,24	-2,98
10 Etanol	2,92	0,058	0,040	1,48	2,14
10 RNA later	0,67	0,013	-0,004	-3,65	-2,17
11 Etanol	2,01	0,040	0,023	1,73	2,13
11 RNA later	1,28	0,026	0,008	3,17	-1,33
12 Etanol	1,93	0,039	0,016	2,49	5,92
12 RNA later	2,17	0,043	0,026	1,65	1,93
13 Etanol	3,49	0,070	0,055	1,28	5,39
13 RNA later	0,97	0,019	0,016	1,25	-1,54
14 FTA	29,12	0,582	0,362	1,61	0,53
14 Etanol	12,58	0,252	0,175	1,44	1,31
15 FTA	12,29	0,246	0,125	1,97	0,70
15 Etanol	9,12	0,182	0,125	1,46	1,33
16 FTA	11,64	0,233	0,166	1,40	0,58
16 Etanol	25,00	0,500	0,360	1,39	0,95
17 FTA	10,47	0,209	0,153	1,37	0,41
18 FTA	5,03	0,101	0,099	1,01	1,01
19 FTA	10,60	0,212	0,149	1,43	0,77
20 FTA	6,74	0,135	0,161	0,84	0,45
20 Etanol	13,05	0,261	0,196	1,33	1,12
21 FTA	8,99	0,180	0,194	0,93	0,42

22 FTA	8,16	0,163	0,131	1,25	0,47
23 FTA	9,09	0,182	0,151	1,20	0,65
24 FTA	12,89	0,258	0,202	1,28	0,88
24 Etanol	14,73	0,295	0,233	1,26	0,92
25 FTA	10,04	0,201	0,168	1,19	0,99
25 RNA later	8,23	0,165	0,126	1,31	1,76
26 FTA	13,40	0,268	0,210	1,28	0,75
26 RNA later	4,59	0,092	0,079	1,16	26,00
27 FTA	11,57	0,231	0,192	1,20	0,89
27 RNA later	4,03	0,081	0,059	1,37	2,91
28 FTA	11,81	0,236	0,184	1,29	1,24
28 Etanol	5,91	0,118	0,079	1,50	-4,93
29 FTA	12,81	0,256	0,210	1,22	0,83
29 Etanol	3,56	0,071	0,043	1,66	-0,69
30 FTA	13,50	0,270	0,209	1,29	0,69
30 Etanol	6,01	0,120	0,069	1,73	2,02
31 FTA	9,43	0,189	0,186	1,02	0,73
32 FTA	8,59	0,172	0,175	0,98	0,79
33 FTA	3,76	0,075	0,135	0,56	0,42
34 Etanol	11,22	0,224	0,147	1,53	1,56
35 Etanol	12,64	0,253	0,170	1,49	0,89
36 Etanol	19,82	0,396	0,277	1,43	0,99
37 Etanol	10,20	0,204	0,147	1,39	1,01
37 RNA later	5,97	0,119	0,087	1,38	2,01
38 Etanol	17,11	0,342	0,261	1,31	0,88
39 Etanol	14,09	0,282	0,211	1,34	1,34
39 RNA later	5,38	0,108	0,077	1,40	1,80
40 Etanol	23,48	0,470	0,332	1,41	0,98
40 RNA later	5,64	0,113	0,080	1,41	5,81
41 Etanol	14,28	0,286	0,206	1,39	1,09
41 RNA later	7,49	0,150	0,132	1,13	1,87
42 Etanol	16,83	0,337	0,232	1,45	1,00
43 Etanol	9,46	0,189	0,122	1,55	0,89
44 Etanol	14,05	0,281	0,192	1,46	1,58
44 RNA later	6,00	0,120	0,071	1,69	4,90
45 Etanol	23,94	0,479	0,333	1,44	1,09
45 RNA later	5,47	0,109	0,073	1,50	10,92
46 Etanol	16,02	0,320	0,212	1,51	1,14
47 Etanol	20,51	0,410	0,297	1,38	0,89
48 Etanol	13,85	0,277	0,203	1,37	0,65
48 RNA later	4,57	0,091	0,055	1,66	-7,44
49 Etanol	23,84	0,477	0,339	1,41	1,15
49 RNA later	11,05	0,221	0,161	1,37	1,36
50 Etanol	31,99	0,640	0,459	1,39	0,76
50 RNA later	6,09	0,122	0,098	1,24	3,66
51 Etanol	17,01	0,340	0,253	1,34	0,78
52 Etanol	13,97	0,279	0,199	1,40	0,70

52 RNA later	2,62	0,052	0,031	1,69	-0,86
53 Etanol	11,16	0,223	0,183	1,22	0,90
53 RNA later	6,71	0,134	0,100	1,34	3,67
54 Etanol	24,01	0,480	0,362	1,33	0,78
55 Etanol	13,46	0,269	0,193	1,40	0,85
56 Etanol	13,05	0,261	0,191	1,37	1,17
57 Etanol	16,87	0,337	0,243	1,39	0,93
58 Etanol	15,39	0,308	0,232	1,32	1,09
59 Etanol	24,23	0,485	0,348	1,39	0,91
60 Etanol	17,09	0,342	0,251	1,36	1,11
60 RNA later	9,23	0,185	0,121	1,53	1,91
61 Etanol	16,67	0,333	0,247	1,35	1,02
62 Etanol	15,23	0,305	0,224	1,36	1,09
63 Etanol	13,70	0,274	0,244	1,12	0,85
64 Etanol	15,18	0,304	0,203	1,49	0,73
65 Etanol	18,65	0,373	0,295	1,27	0,81
66 Etanol	11,94	0,239	0,247	0,97	0,78
66 RNA later	7,32	0,146	0,100	1,46	-10,18
67 Etanol	13,87	0,277	0,216	1,29	1,11
67 RNA later	9,19	0,184	0,135	1,36	2,94
68 Etanol	13,30	0,266	0,207	1,28	1,00
68 RNA later	8,71	0,174	0,126	1,39	1,45
69 Etanol	15,29	0,306	0,230	1,33	0,95
69 RNA later	7,11	0,142	0,091	1,56	7,18
70 Etanol	16,62	0,332	0,255	1,31	1,15
70 RNA later	9,25	0,185	0,128	1,44	1,50
71 FTA	12,37	0,247	0,196	1,26	1,06
71 Etanol	7,87	0,157	0,129	1,22	1,88
72 FTA	9,26	0,185	0,142	1,30	2,37
73 FTA	11,79	0,236	0,209	1,13	1,04
74 Etanol	22,26	0,445	0,353	1,26	0,91
75 Etanol	10,57	0,211	0,193	1,09	0,89
76 Etanol	18,98	0,380	0,303	1,25	0,99
77 Etanol	10,30	0,206	0,175	1,18	0,39
77 Zaragatoa	31,58	0,632	0,406	1,56	0,95
78 Etanol	11,55	0,231	0,201	1,15	0,53
78 RNA later	7,10	0,142	0,108	1,32	1,86
79 Etanol	10,62	0,212	0,199	1,06	0,89
80 RNA later	12,88	0,258	0,220	1,17	0,84
80 Etanol	21,79	0,436	0,327	1,33	1,05
81 Etanol	14,30	0,286	0,253	1,13	0,87

^a Os números presentes nesta coluna correspondem ao n° da amostra. FTA – amostra conservada em FTA; Etanol – amostra conservada em etanol; RNA later – amostra conservada em RNA later; Zaragatoa – amostra recolhida por esfregaço bucal

2. Detecção da mutação

Após a genotipagem por sequenciação automática e obtenção dos electroferogramas (Figura 7) para os indivíduos analisados foi calculada a frequência alélica e a frequência dos heterozigóticos.

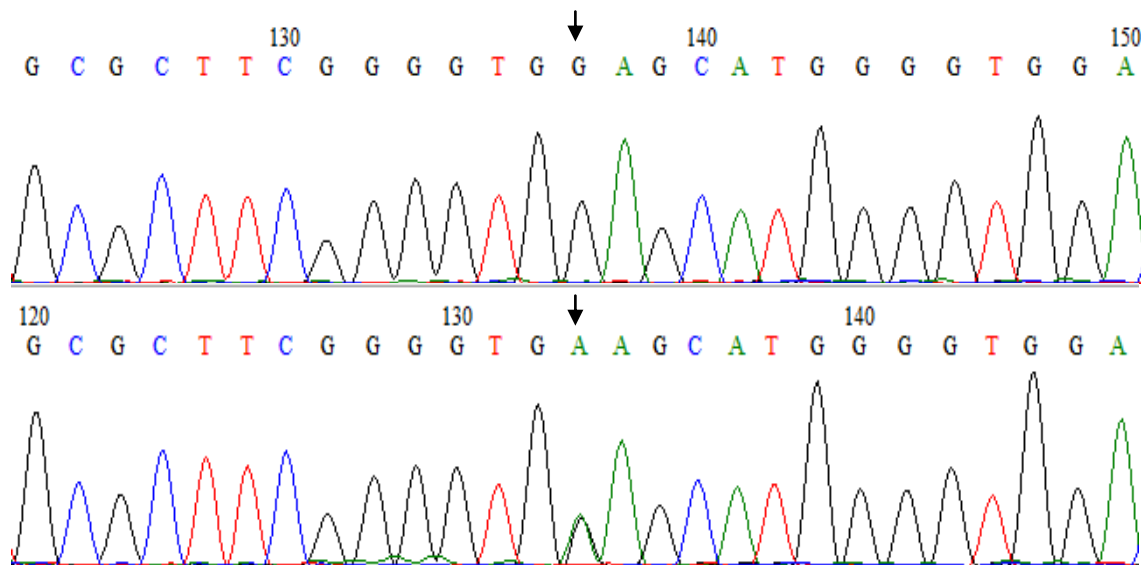


Figura 7: Exemplo de um electroferograma obtido pela genotipagem de dois indivíduos: um homozigótico, sem mutação (electroferograma superior) e outro heterozigótico (electroferograma inferior)

Os resultados da genotipagem foram visualizados nos electroferogramas que registam os picos de fluorescência lidos pelo sequenciador. A posição relativa do pico que corresponde ao conjunto primer/ddNTP marcado indica o *locus*, enquanto que a cor do pico corresponde ao nucleótido presente em cada *locus* (Azul=C, Preto=G, Verde=A e Vermelho=T). Quando as sequências foram amplificadas com o *primer reverse* as cores dos picos passam então a corresponder às bases complementares.

Os indivíduos que são homozigóticos para este *locus* apresentam os ddNTPs marcados ligados ao *primer* nesta posição com o mesmo fluorocromo, o que gera um único pico no electroferograma. Os indivíduos que são heterozigóticos para este *locus* apresentam diferentes ddNTPs ligados ao *primer* nesta posição, cada qual com um fluorocromo gerando dois picos diferentes.

Infelizmente não foi possível obter resultados para todos os indivíduos analisados, pois alguns foram totalmente impossíveis de amplificar, outros apesar de terem sido amplificados não se conseguiu obter electroferogramas com qualidade. A falta de qualidade dos electroferogramas ficou a dever-se à elevada degradação das amostras, que fez com que o fragmento produzido fosse pouco concentrado e ainda se encontrassem presentes resquícios da amostra degradada, o que gerou vários picos para cada *locus*. Tornou-se então impossível definir o genótipo desses indivíduos, mesmo após várias repetições. Foi então obtida a informação alélica de 66 indivíduos dos 81 originais.

A tabela 5 apresenta a frequência de cada um dos genótipos dos 66 indivíduos dos quais se obteve a informação alélica.

Tabela 5: Número de indivíduos portador de cada um dos genótipos

	GG	GA	AA
Frequência Absoluta	64	2	0
Frequência Relativa	0,97	0,03	0

Pela análise da sequenciação observa-se que os heterozigóticos têm uma frequência de 3% na população em estudo e não se encontra presente nenhum homozigótico para a mutação (AA). Observa-se então que a frequência do alelo mutado nesta população é de 1,5%.

As populações comparativas (dados em Machado *et al*, 2012) apresentam as seguintes frequências de heterozigóticos: 6,7% de heterozigóticos na população de Angola (11 indivíduos); 2,6% de heterozigóticos na população da Guiné Equatorial (1 indivíduo); 3,0% de heterozigóticos na população de São Tomé e Príncipe (2 indivíduos). Assim, a frequência do alelo mutado é de 3,4% para a população de Angola, 1,3% para a população da Guiné Equatorial e 1,5% para a população de São Tomé e Príncipe. A população moçambicana apresenta uma frequência de portadores da mutação de 5,8% e uma frequência alélica de 3,8%. A população de Moçambique foi a

única a apresentar um indivíduo homozigótico para a mutação (AA). A população portuguesa não apresentou qualquer indivíduo com a mutação.

3. Análise dos resultados

As frequências alélicas para o grupo de indivíduos em estudo encontram-se em equilíbrio de *Hardy-Weinberg* ($P=1,00$), confirmando-se a hipótese nula (estes indivíduos encontram-se em equilíbrio).

Ainda com base na frequência dos genótipos e recorrendo ao teste estatístico adequado (F_{ST}) comparou-se a população da Guiné-Bissau com as outras populações africanas. Os valores de F_{ST} obtidos (Tabela 6) não são significativos.

Tabela 6: F_{ST} e o valor de p da comparação da população da Guiné Bissau com as outras populações africanas

Países	F_{ST}	Valor de p
Guiné-Bissau/Guiné Equatorial	-0.01033	0.99099
Guiné-Bissau/São Tomé e Príncipe	-0.00757	0.99099
Guiné-Bissau/Angola	0.00093	0.33333
Guiné-Bissau/Moçambique	0.00125	0.22523

V. Discussão

Tendo em consideração o facto de a malária ser uma doença com um impacto enorme e uma elevada taxa de mortalidade, considera-se que tem sido uma das maiores forças selectivas da história recente da humanidade e como tal, os genes que lhe conferem resistência são fortemente seleccionados positivamente. Para além desta forte selecção sobre cada um dos genes ou variantes que conferem resistência à malária, observa-se também uma grande sobreposição entre esses genes numa população, o que faz com que alguns indivíduos tenham mais que uma variante associada a uma eventual resistência à malária (Hedrick, 2011). O facto de existir uma tão ampla panóplia de genes e de muitas vezes estes interagirem entre si, dificulta a compreensão real da forma como cada um destes genes protegem contra a doença, retardando o desenvolvimento de uma terapêutica eficaz e a obtenção de medicação preventiva. O estudo destes factores genéticos do hospedeiro determinantes de uma maior ou menor resistência a esta infeção, é portanto de grande utilidade.

Este estudo pretendeu acrescentar mais alguns dados que possam ajudar a compreender uma possível relação entre a mutação G829A da piruvato cinase e a resistência à malária.

Esta mutação foi escolhida pelo facto de haverem estudos anteriores recentes em diversos países africanos de regiões onde a malária é endémica, e ter sido sempre identificada nestes países com níveis de frequência bastante idênticos.

A análise dos dados obtidos permitiu observar a mutação G829A da piruvato cinase em indivíduos da Guiné-Bissau, estando de acordo com outros já obtidos em diferentes países africanos onde a malária também é endémica e onde já tinha sido observada a mutação. É de realçar ainda que, para além de se ter encontrado a mutação, esta se encontra presente na população da Guiné-Bissau em percentagens que se enquadram no intervalo de valores já obtido nos outros países africanos (Machado *et al*, 2012). É ainda importante referir que, esta mutação nunca foi encontrada em indivíduos fora de zonas endémicas para a malária. A população portuguesa foi utilizada para fins comparativos e a mutação não foi encontrada em nenhum dos 74 indivíduos analisados.

A frequência dos alelos em estudo está em conformidade com o equilíbrio de *Hardy-Weinberg*. A mutação G829A foi detectada com uma frequência alélica de 1,5% o que se enquadra nos 1,3% a 3,4% já encontrados por Machado *et al.* (2012), em outras populações africanas, não sendo detectada na população portuguesa. Embora possam ser então distinguidos dois grupos de populações africanas, estabelecidos a partir das frequências alélicas: as frequências mais elevadas (Angola e Moçambique) e as frequências baixas (São Tomé e Príncipe, Guiné Equatorial e Guiné Bissau), os valores de F_{ST} não são significativamente diferentes entre eles. A diferença nas frequências poderá dever-se à diferente dimensão amostral dos grupos estudados, representando assim um artefacto, uma vez que o grupo com frequências mais elevadas é também o com maior número de amostras analisadas, e o inverso também se observa. Outra razão para a diferença nas frequências pode ser a subestrutura da população entre as regiões geográficas.

A prevalência da deficiência do PK parece variar grandemente entre os grupos étnicos e as regiões geográficas, tal como as mutações presentes no gene PKLR. Alguns autores estimaram a prevalência da deficiência de 1 em cada 20.000 indivíduos na população branca em geral (Beutler & Gelbart, 2000a). Esta mutação em particular foi sempre descrita em indivíduos provenientes de países onde a malária é endémica e nunca foi observada uma incidência muito elevada. Este estudo em particular não permite estabelecer uma relação concreta entre a mutação e a resistência à malária, uma vez que não é feita uma análise à actividade enzimática da proteína produzida por cada um dos indivíduos, nem foi possível estabelecer graus de doença.

O facto de existirem um grande número mutações associada à resistência à malária e das enzimopatias serem uma resposta frequente, leva a crer que a possibilidade da deficiência na piruvato cinase poder também estar associada com uma possível resistência à infecção malárica ou à doença grave não é uma hipótese muito esdrúxula. A relação directa entre esta mutação em concreto e a doença é ainda mais difícil de estabelecer neste cenário, no entanto o facto de esta mutação só ter sido encontrada em indivíduos oriundos de países onde a malária é endémica, torna esta hipótese mais provável.

Durante a realização do trabalho foram encontrados diversos constrangimentos que se iniciaram logo aquando da recolha da amostra, uma vez que as condições de

conservação e transporte das amostras recolhidas não foram as mais adequadas o que levou a uma muito provável degradação das amostras. Para além desta facto as amostras foram inicialmente recolhidas para a análise de um outro gene, que foi impossível de analisar devido às restrições impostas pela amostragem efectuada, como tal houve dados de cariz clínico que apresentariam relevância para esta análise, que como não seriam relevantes para a análise inicial não foram recolhidos. Todo o processo de obtenção das amostras prolongou-se mais no tempo do que o que seria inicialmente esperado (demorando cerca de semestre e meio) condicionando assim a tentativa de análise de outros genes na amostra.

Foram ainda registadas dificuldades no processo de optimização laboratorial, uma vez que a degradação das amostras impossibilitou a obtenção de um protocolo único que funcionasse, pelo menos, para a grande maioria da amostragem.

VI. Considerações finais

Ao iniciar este estudo pretendia-se fazer uma comparação étnica entre populações com diferentes graus de resistência à malária para alelos de um gene imunitário. No entanto, devido a problemas que surgiram no decorrer do trabalho foi impossível fazer essa análise, tendo a mesma sido adaptada à análise do gene e da mutação aqui apresentados.

Este trabalho surge assim, como um estudo que pretende adicionar mais alguns dados aos já obtidos para esta mutação em outras populações africanas (Moçambique, Angola, Guiné Equatorial e São Tomé e Príncipe) sujeitas à malária, para que o conjunto de todos os dados (que são bastante semelhantes) possa dar uma melhor luz sobre uma eventual associação entre esta mutação e a malária. É extremamente importante que se realizem mais estudos nesta área, englobando uma maior população de estudo, fazendo a descrição clínica para a malária e registando os vários *outcomes*, realizando a análise da actividade enzimática da proteína produzida por cada um dos indivíduos e de forma a que seja possível estabelecer graus de incidência da doença para assim ser exequível o estudo de uma possível associação da deficiência com a malária. Estes estudos devem focar-se tanto em populações de zonas onde a malária é endémica, como em populações onde não há malária, para assim corroborar o papel da mutação na resistência à doença.

VII. Referências bibliográficas

Abu-Melha, A.M., Ahmed, M.A., Knox-Macaulay, H., Al-Sowayan, S.A. & El-Yahia A. (1991) Erythrocyte pyruvate kinase deficiency in newborns of eastern Saudi Arabia. *Acta haematologica*, **85(4)**, 192-194.

Allison, A.C. (2009) Genetic control of resistance to human malaria. *Current Opinion in Immunology*, **21(5)**, 499-505.

Ayi, K., Liles, W.C., Gros, P. & Kain, K.C. (2009) Adenosine triphosphate depletion of erythrocytes simulates the phenotype associated with pyruvate kinase deficiency and confers protection against *Plasmodium falciparum* in vitro. *The Journal of Infectious Diseases*, **200(8)**, 1289-1299.

Ayi, K., Min-Oo, G., Serghides, L., Crockett, M., Kirby-Allen, M., Quirt, I., Gros, P. & Kain, K.C. (2008) Pyruvate kinase deficiency and malaria. *New England Journal of Medicine*, **358(17)**, 1805-1810.

Berghout, J., Higgins, S., Loucoubar, C., Sakuntabhai, A., Kain, K.C. & Gros, P. (2012) Genetic diversity in human erythrocyte pyruvate kinase. *Genes and Immunity*, **13(1)**, 98-102.

Beutler, E. & Gelbart, T. (2000a) Estimating the prevalence of pyruvate kinase deficiency from the gene frequency in the general white population. *Blood*, **95(11)**, 3585-3588.

Beutler, E. & Gelbart, T. (2000b) PK deficiency prevalence and the limitations of a population-based survey. *Blood*, **96(12)**, 4005-4006.

Carey, P. J., Chandler, J., Hendrick, A. Reid, M.M., Saunders, P.W.G., Tinegate, H., Taylor, P.R. & West, N. (2000) Prevalence of pyruvate kinase deficiency in a northern European population in the north of England. *Blood*, **96(12)**, 4005.

Crutcher, J.M., Hoffman, S.L (1996) Medical Microbiology, Capítulo 83 - Malaria. Quarta Edição. Samuel Baron editor. *Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston*.

Durand, P.M. & Coetzer, T.L. (2008) Pyruvate kinase deficiency protects against malaria in humans. *Haematologica*, **93(6)**, 939-940.

Excoffier, L. & Lischer, H.E. L. (2010) Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*, **10(3)**, 564-567.

Feng, C.S., Tsang, S.S. & Mak, Y.T. (1993) Prevalence of pyruvate kinase deficiency among the Chinese: determination by the quantitative assay. *American journal of hematology*, **43(4)**, 271-273.

Hendrick, P.W. (2011) Population genetics of malaria resistance in humans. *Heredity*, **107(4)**, 283-304.

Hickman, C.P., Roberts, L.S., Keen, S.L., Larson, A., l'Anson, H. & Eisenhour, D.J. (2008) Integrated principles of zoology. *McGraw-Hill Higher Education*.

Machado, P., Manco, L., Gomes, C., Mendes, C., Fernandes, N., Salomé, G., Siteo, L., Chibute, S., Langa, J., Ribeiro, L., Miranda, J., Cano, J., Pinto, J., Amorim, A., Rosário, V.E. & Arez, A.P (2012). *Plos One*, **7(10)**, e47071.

Manco, L. & Ribeiro, M.L. (2009) Novel human pathological mutations. Gene symbol: PKLR. Disease: pyruvate kinase deficiency. *Human genetics*, **125(3)**, 343.

Min-Oo, G., Fortin, A., Tam, M-F., Gros, P. & Stevenson, M.M. (2004) Phenotypic expression of pyruvate kinase deficiency and protection against malaria in a mouse model. *Genes and Immunity*, **5(3)**, 168-175.

Min-Oo, G., Fortin, A., Tam, M-F., Nantel, A., Stevenson, M.M. & Gros, P. (2003) Pyruvate kinase deficiency in mice protects against malaria. *Nature Genetics*, **35(4)**, 357-362.

Min-Oo, G. & Gros, P. (2005) Erythrocyte variants and the nature of their malaria protective effect. *Cellular Microbiology*, **7(6)**, 753-763.

Min-Oo, G., Tam, M., Stevenson, M.M. & Gros, P. (2007) Pyruvate kinase deficiency: correlation between enzyme activity, extent of hemolytic anemia and protection against malaria in independent mouse mutants. *Blood cells, molecules & diseases*, **39(1)**, 63-69.

Valentini, G., Chiarelli, L.R., Fortin, R., Dolzan, M., Galizzi, A., Abraham, D.J., Wang, C., Bianchi, P., Zanella, A. & Mattevi, A. (2002) Structure and function of human erythrocyte pyruvate kinase. Molecular basis of nonspherocytic hemolytic anemia. *The Journal of Biological Chemistry*, **277(26)**, 23807-23814.

Van Solinge, W.W., Kraaijenhagen, R.J., Rijksen G. & Nielsen, F.C., (1997) Novel mutations in the human red cell type pyruvate kinase gene: two promoter mutations in cis, a splice site mutation, a nonsense- and three missense mutations. *Blood*, **90(10)**, 1197-1197.

Verra, F., Mangano, V.D. & Modiano, D. (2009) Genetics of susceptibility to *Plasmodium falciparum*: from classical malaria resistance genes towards genome-wide association studies. *Parasite Immunology*, **31(5)**, 234-253.

World Health Organization (WHO) (2012) World Malaria Report. [pdf] *Geneva: WHO Press*.

Yavarian, M., Karimi, M., Shahriary, M. & Afrasiabi, A.R. (2008) Prevalence of pyruvate kinase deficiency among the south Iranian population: quantitative assay and molecular analysis. *Blood cells, molecules & diseases*, **40(3)**, 308-311.

Zanella, A. & Bianchi, P. (2000) Red cell pyruvate kinase deficiency: from genetics to clinical manifestations. *Baillière's best practice & research. Clinical haematology*, **13(1)**, 57-81.

Zanella, A., Fermo, E., Bianchi, P., Chiarelli, L.R. & Valentini, G. (2007) Pyruvate kinase deficiency: The genotype-phenotype association. *Blood Reviews*, **21(4)**, 217-231.

Zanella, A., Fermo, E., Bianchi, P. & Valentini, G. (2005) Red cell pyruvate kinase deficiency: molecular and clinical aspects. *British Journal of Haematology*, **130(1)**, 11-25.

Zucker, J.R. (1996) Changing Patterns of Autochthonous Malaria Transmission in the United States: A Review of Recent Outbreaks. *Emerging Infectious Diseases*, **2(1)**, 37-43.

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Undef&id=5820&lvl=3&srchmode=1&keep=1&unlock>) (consultado dia 14/06/2013)

(<http://www.cdc.gov/malaria/about/biology/>) (consultado dia 14/10/2013)

(<http://www.cdc.gov/malaria/about/disease.html>) (consultado dia 18/06/2013)

(http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Endemic_Countries_2012.jpg) (consultado dia 19/02/2013)

(<http://pt.wikipedia.org/wiki/Ficheiro:Glicolise-gliconeogenese.png>) (consultado 6/10/2013)

ANEXOS

Anexo 1



Genotipagem de etnias da Guiné-Bissau em relação a marcadores relevantes para o estudo da incidência da Malária.



Nome: _____

Código da amostra: _____

Elementos demográficos:

1. Sexo _____
2. Idade _____
 - 2.1 Se é mulher, está grávida _____
3. Ascendência Étnica _____
4. Residência _____
5. Acede a cuidados médicos regularmente _____

Elementos de transmissão:

1. Utilização de rede mosquiteira _____
2. Utilização de redes tratadas com insecticidas _____
3. Utilização de repelentes _____
4. Tapa os recipientes que contêm água no ambiente doméstico _____
5. Limpa regularmente os recipientes que contêm água _____
6. Recebeu alguma informação sobre como controlar os mosquitos _____

7. Outras estratégias _____

Elementos de incidência:

1. É a primeira vez que lhe foi diagnosticada malária _____

1.1. Quantas vezes já lhe foi diagnosticada malária _____

1.2 Que tratamento efectuou _____

1.3 Sentiu alguma mudança na sintomatologia das vezes em que lhe foi diagnosticada malária _____

2. O que faz quando sente sintomas _____

2.1 Vai ao posto médico _____

2.2 Prefere a terapêutica convencional _____

2.3 Prefere tomar remédios tradicionais _____

2.3.1 Se sim, quais _____

3. Já contraiu outras infecções _____

3.1 Se sim, quais _____

4. Já contraiu outras infecções simultaneamente com o diagnóstico de malária _____

4.1 Se sim, quais _____

Anexo 2



Genotipagem de etnias da Guiné-Bissau em relação a marcadores relevantes para o estudo da incidência da Malária.



Ficha informativa

Está a ser convidado a participar num estudo anónimo. Antes de decidir se deseja participar no mesmo é importante que compreenda porque é que a investigação está a ser realizada e o que envolve. Por favor, ouça as informações seguintes com atenção.

- **Qual é o objectivo do estudo?**

Este estudo tem como objectivo analisar as frequências alélicas dos genes HLA-DRB1 e HLA-DQB1 com vista a encontrar alelos que confirmam resistência à malária, para que estes alelos possa estabelecer uma relação entre estes marcadores e indivíduos menos sujeitos à doença

- **Quem será escolhido para o estudo e terá obrigatoriamente de participar?**

Serão incluídos no projecto voluntários que vivam cheguem às unidades hospitalares em estudo com sintomas de malária que será diagnosticada pelo teste rápido ou microscopia. A participação neste estudo é voluntária e os participantes poderão escolher se querem reconsiderar a mesma a qualquer momento.

- **O que acontecerá se participar e o que terei de fazer?**

Serão recolhidas amostras de sangue, em recipiente adequados e devolvidos ao investigador, sendo armazenadas e subsequentemente analisadas.

- **Quais são as desvantagens possíveis e riscos da minha participação?**

Não há riscos associados na participação neste estudo, desde que se observem princípios básicos de higiene, aquando da recolha das amostras. Estas poderão ser explicadas com mais detalhe se for necessário e se for seleccionado para este estudo.

- **Quais são as vantagens de participar?**

Irá contribuir para a nossa compreensão da relação entre determinados alelos e a resistência apresentada por alguns indivíduos à malária. Este tipo de pesquisa ajuda-nos a desenvolver uma melhor compreensão da doença.

- **E se houver algum problema?**

Não antecipo que haja algum problema no facultar amostras de sangue. Contudo, caso pretenda abandonar o estudo, poderá fazê-lo a qualquer momento.

- **A minha participação no estudo será mantida confidencial?**

Sim, toda a informação que é facultada no questionário não poderá ser seguida até si. Somente eu tenho acesso aos dados que serão devidamente armazenados de acordo com a Lei de Protecção de Dados. As amostras serão tornadas anónimas com um código único. Serão armazenadas indefinidamente com acesso restrito de acordo com a Lei de Protecção de tecidos humanos.

- **O que acontecerá aos resultados da investigação?**

Os resultados da investigação serão apresentados em reuniões científicas e publicados em revistas científicas de reputação, para que outros investigadores e o público possam compreender uma possível relação entre factores genéticos e a incidência da malária. A sua identidade não será revelada em nenhuma destas apresentações ou publicações.

- **Quem devo contactar para mais informações sobre a investigação?**

Poderá contactar: Rui Sá
email: ruimoutinhosa@gmail.com

Se alguma coisa não estiver clara nesta ficha informativa, por favor fale com Rui Sá (detalhes supracitados).

Muito obrigado pelo tempo dispendido na audição desta informação. Se pretende participar, deverá guardar esta ficha informativa e começar por assinar o Formulário de Consentimento Informado.

- **E agora?**

Ser-lhe-á providenciado um Formulário de Consentimento Informado. Por favor leia-o e assine-o se quiser ser incluído neste estudo.

Anexo 3



Formulário de Consentimento Informado



Título do Estudo: Genotipagem de etnias da Guiné-Bissau em relação a marcadores relevantes para o estudo da incidência da Malária.

Professores Orientadores: Prof. Octávio Paulo, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa
Dra. Ana Paula Arez, Instituto de Higiene e Medicina Tropical

O investigador envolvido neste projecto não é um médico qualificado. É importante que compreenda que esta actividade não irá facultar nenhuma informação que possa ajudar ao diagnóstico de uma condição médica, bem como não deve considerar os resultados obtidos destas experiências como um procedimento de projecção médica. Se tiver problemas de saúde deverá contactar um médico qualificado, tal como o seu médico de família, como habitualmente.

1. Confirmo que recebi e compreendi a informação que me foi providenciada relativa ao estudo referido anteriormente. Tive a oportunidade de considerar a informação, de fazer perguntas e que as mesmas me foram esclarecidas satisfatoriamente.
2. Compreendo que a minha participação é voluntária e que sou livre de reconsiderar a qualquer momento, sem justificações, e sem que os meus cuidados médicos e direitos legais sejam afectados.
3. Não tenho conhecimento de nenhuma circunstância ou condição que possa afectar a minha compatibilidade em participar neste estudo e responsabilizo-me a revelar qualquer informação que possa ser relevante.
4. Compreendo que a informação que facultarei será tratada anonimamente, de forma que é impossível traçar esta informação até mim, individualmente. Compreendo que esta informação poderá ficar retida indefinidamente.

Concordo em participar no estudo referido anteriormente.

Nome _____

Data _____

Assinatura _____

Poderá contactar: Rui Sá

email: ruimoutinhosa@gmail.com

Anexo 4



Formulário de Consentimento Informado



Título do Estudo: Genotipagem de etnias da Guiné-Bissau em relação a marcadores relevantes para o estudo da incidência da Malária.

Professores Orientadores: Prof. Octávio Paulo, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa
Dra. Ana Paula Arez, Instituto de Higiene e Medicina Tropical

O investigador envolvido neste projecto não é um médico qualificado. É importante que compreenda que esta actividade não irá facultar nenhuma informação que possa ajudar ao diagnóstico de uma condição médica, bem como não deve considerar os resultados obtidos destas experiências como um procedimento de projecção médica. Se tiver problemas de saúde deverá contactar um médico qualificado, tal como o seu médico de família, como habitualmente.

Eu, _____ como representante legal do menor _____ :

1. Confirmando que recebi e compreendi a informação que me foi providenciada relativa ao estudo referido anteriormente. Tive a oportunidade de considerar a informação, de fazer perguntas e que as mesmas me foram esclarecidas satisfatoriamente.
2. Compreendo que a minha participação é voluntária e que sou livre de reconsiderar a qualquer momento, sem justificações, e sem que os meus cuidados médicos e direitos legais sejam afectados.
3. Não tenho conhecimento de nenhuma circunstância ou condição que possa afectar a minha compatibilidade em participar neste estudo e responsabilizo-me a revelar qualquer informação que possa ser relevante.
4. Compreendo que a informação que facultarei será tratada anonimamente, de forma que é impossível traçar esta informação até mim, individualmente. Compreendo que esta informação poderá ficar retida indefinidamente.

Concordo em participar no estudo referido anteriormente.

Nome _____

Data _____

Assinatura _____

Poderá contactar: Rui Sá
email: ruimoutinhosa@gmail.com