

# Focalização isoeétrica na identificação das hemoglobinas

Primeira submissão em 27/07/05  
Última submissão em 12/04/06  
Aceito para publicação em 08/05/06  
Publicado em 20/06/06

## *The isoelectric focusing for hemoglobin identification*

Luciane Cristina Bertholo<sup>1</sup>; Haroldo Wilson Moreira<sup>2</sup>

unitermos	resumo
Focalização isoeétrica	<p>Introdução: Considerando a significativa frequência das hemoglobinopatias na população brasileira e a necessidade do estabelecimento de metodologia confiável, rápida, reprodutível e possível de ser aplicada a um grande número de amostras, foi objetivo desse trabalho analisar as diferenças observadas pelas metodologias eletroforéticas em acetato de celulose e em ágar amido em comparação com a focalização isoeétrica (IEF) e o estabelecimento de um padrão amostral apresentando as principais posições das hemoglobinas anormais, com enfoque nas observadas na população brasileira. Casuística e métodos: O material de estudo foi constituído por amostras de sangue de pacientes laboratoriais e doadores pertencentes à região central do estado de São Paulo, Brasil, e nelas aplicamos os testes de rotina laboratorial. Para efeito de comparação e validade das provas laboratoriais, correlacionamos os resultados dos testes com a técnica de focalização isoeétrica. Resultados e discussão: Os resultados observados em cada procedimento, somados aos dados de literatura, permitiram estabelecer padrões de migração para cada sistema eletroforético das hemoglobinas observadas na população brasileira. Dessa forma foram estruturados quadros com a possibilidade do uso dos mesmos evidenciando a facilidade e a viabilidade dessa técnica por diferentes laboratórios.</p>
Hemoglobinopatias	
Diagnóstico laboratorial	

## abstract

## key words

*Background: Considering the significant frequency of hemoglobinopathies in the Brazilian population and the necessity of establishing a reliable methodology, quick, reproductive and possible to be applied in a large number of samples, it was the objective of this work to analyze the differences on electrophoretic procedures with cellulose acetate and acid agar compared with isoelectric focusing (IEF), and to establish a standard of migration, presenting main positions of abnormal hemoglobin, based on Brazilian population hemoglobin. Material and method: The studied material was formed by blood samples from laboratory patients and blood donors of São Paulo state central area, Brazil, and applied laboratory routines tests. For a reasonable comparison and validation of laboratory tests, we related the results with isoelectric focusing. Results and discussion: These observations added to literature accounts allowed the establishment of standards of migration all over hemoglobinopathies observed in the Brazilian population. In this way, charts were developed to demonstrate the simplicity and viability of this technique by different laboratories.*

*Isoelectric focusing  
Hemoglobinopathies  
Laboratories diagnostic*

1. Mestra em Análises Clínicas pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista (FCF/UNESP); professora-assistente da Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul (UNIJUÍ).

2. Professor-titular do Departamento de Análises Clínicas da FCF/UNESP.

Trabalho realizado no Laboratório da Disciplina de Hematologia Clínica da FCF/UNESP. Dissertação apresentada para obtenção do grau de mestre em Análises Clínicas, área de Concentração em Análises Clínicas da FCF/UNESP, em 2001.

## Introdução

As hemoglobinopatias constituem um grupo de alterações hereditárias prevalentes em muitas regiões do mundo, sendo decorrentes de alterações em genes estruturais, responsáveis pelo aparecimento das hemoglobinas variantes ou alterações em genes reguladores, resultando nas talassemias<sup>(11)</sup>.

A frequência das hemoglobinopatias observadas numa população varia na dependência dos grupos raciais que originalmente colonizaram a região analisada e, mesmo numa região específica, sabemos que essa frequência pode variar, dependendo do grupo que se analisa na população escolhida, principalmente ao se separar os grupos caucásios e não-caucásios<sup>(9)</sup>.

A formação da população brasileira teve influência inicial dos nativos, dos colonizadores portugueses e dos escravos africanos, sendo que mais tarde sofreu maciça contribuição de povos europeus e asiáticos, principalmente de italianos, espanhóis, alemães e japoneses.

O Brasil tem dimensões continentais, com aproximadamente 8,5 milhões de km<sup>2</sup>, sendo composto por 26 estados e o Distrito Federal, sede do governo federal. Sua população apresenta perto de 169 milhões de habitantes distribuídos em 54% de brancos, 39,5% de mestiços, 5,7% de negros, 0,6% de asiáticos e 0,2% de indígenas americanos<sup>(5)</sup>.

O estado de São Paulo, localizado na região Sudeste do Brasil, é o mais rico do país, o que propiciou, com o passar do tempo, uma crescente e contínua migração de populações de outros estados em busca de melhores condições de vida. Além disso, de 1827 a 1932 recebeu 2,6 milhões de migrantes, sendo 36% de italianos, 15% de portugueses, 14% de espanhóis, 4% de japoneses, 20% de alemães, árabes, austríacos, russos e poloneses e 11% de povos de outros países<sup>(7, 8)</sup>. São Paulo, uma cidade cosmopolita, capital do estado de mesmo nome, tem mais de 10 milhões de habitantes<sup>(5)</sup>.

Esse intenso fluxo populacional, a miscigenação entre os povos e os diferentes padrões genéticos referentes ao polimorfismo das hemoglobinas propiciaram, no decorrer das gerações, o aparecimento de inúmeras hemoglobinopatias. O estado de homozigose, via de regra, desaparecia por causa de sua gravidade, preservando os heterozigotos que apresentavam formas mais brandas da doença, denominadas de traço ou estigma, com a possibilidade de deixar descendentes, mantendo, deste modo, o gene na população.

Essas patologias podem ser identificadas por procedimentos eletroforéticos, mais comumente pelas

eletroforeses em acetato de celulose alcalina, em ágar ácido, e menos freqüentemente pela focalização isoeletrica em gel de poliacrilamida ou em agarose em diferentes pHs<sup>(3, 4, 12, 13, 16, 17, 20, 23)</sup>.

Estudos populacionais realizados em várias regiões de nosso país demonstraram porcentagens que variam entre 0,1% a 1% para as hemoglobinas menos freqüentes e para aquelas com padrão homozigótico e de 1,5% a 10% para as consideradas heterozigóticas, quer sejam hemoglobinas variantes ou talassemias<sup>(1, 2, 6, 13-15, 22, 24)</sup>.

Considerando-se a frequência das hemoglobinopatias na população brasileira e a necessidade do estabelecimento de metodologia confiável, rápida, reprodutível e possível de ser aplicada a um grande número de amostras quando em estudos populacionais, foi objetivo desse trabalho analisar as diferenças observadas pelas metodologias eletroforéticas em acetato de celulose e em ágar amido, em comparação com a focalização isoeletrica (IEF) e o estabelecimento de um padrão amostral a ser utilizado nesse sistema apresentando as principais posições das hemoglobinas anormais, com enfoque naquelas observadas na população brasileira.

## Casuística e métodos

O material de estudo foi constituído por 8.351 amostras de sangue, sendo 6.271 de pacientes laboratoriais e 2.080 de doadores de sangue, todos pertencentes à região central do estado de São Paulo, Brasil. Amostras não usualmente detectadas em nossa região e que tínhamos o interesse de acrescentar ao nosso estudo foram obtidas em outros laboratórios que se ocupam dessa identificação.

Nessas amostras aplicamos os testes da rotina laboratorial na caracterização de hemoglobinopatias, a saber: eletroforese qualitativa e quantitativa em pH alcalino<sup>(12)</sup> e eletroforese qualitativa em pH ácido<sup>(23)</sup>. Para efeito de comparação e validade das provas laboratoriais e de nossos objetivos, associamos a esses testes a técnica de focalização isoeletrica<sup>(13, 16, 17, 20)</sup>.

Para essa última, o hemolisado obtido de sangue total colhido com anticoagulante não foi processado com solventes orgânicos, do tipo clorofórmio, pois este pode precipitar algumas hemoglobinas (incluindo a hemoglobina Bart's) e cadeias alfa livres, o que poderia propiciar a não-identificação de algumas hemoglobinas anormais. Deste modo, o mesmo era obtido com solução de cianeto de potássio a 0,05%, fazendo-se uma diluição de 4µl da papa de hemácias em 25µl de solução de cianeto de potássio a 0,05%.

A focalização isoeétrica foi realizada num aparelho Multiphor LKB em gel de poliacrilamida a 20% contendo uma mistura de anfólitos com pH 6-8 e pH 7-9, sendo a polimerização estabelecida pela adição de persulfato de amônio e N,N,N',N'-tetrametilenediamina (TEMED). A migração foi processada com uma tensão de 1.500 volts e corrente de 20mA para um gel de 260 x 125 x 0,5mm. Após a migração, as frações foram fixadas com ácido tricloroacético a 20% por 5 a 10 minutos.

O presente trabalho foi desenvolvido cumprindo-se os princípios éticos estabelecidos na Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde (CNS).

## Resultados e discussão

Como a população brasileira apresenta um alto grau de mistura racial devido à imigração dos colonizadores e posteriormente de outros povos, os resultados observados em cada procedimento, somados aos dados da literatura, permitiram estabelecer padrões de migração para cada sistema e válidos para amostras possíveis de serem observadas na nossa população. Dessa forma foram estruturadas as **Figuras 1 e 2**, onde apresentamos as posições das bandas das mutações variantes de cadeia beta, instáveis beta, variantes delta, variantes alfa, instáveis alfa e talassemias dos tipos beta, alfa e delta-beta, em eletroforese em acetato de celulose, em ágar ácido e em focalização isoeétrica.

A identificação dos fenótipos das hemoglobinas normais e anormais tem sido realizada rotineiramente por procedimentos eletroforéticos, utilizando-se como suporte o acetato de celulose em pH alcalino. A essa metodologia alguns raros laboratórios associam outros sistemas em diferentes suportes, como géis constituídos por ágar, agarose ou uma mistura de ágar-amido em pH ácido, alcalino, ou até mesmo neutro.

As análises laboratoriais têm mostrado que as metodologias utilizadas na rotina para a identificação das hemoglobinopatias nem sempre apresentam a resolução necessária para as perfeitas visualização e caracterização de algumas frações, como aquelas com concentrações inferiores a 1%; frações que migram na mesma posição, quer seja em pH alcalino, quer em pH ácido; frações de hemoglobinas instáveis que se desnaturam pelos métodos usuais de obtenção do hemolisado com solventes orgânicos; frações que, em recém-nascidos, apresentam concentrações ínfimas e de difícil visualização; e frações de mutantes de cadeia alfa que migram de forma rápida, o que pode prejudicar a observação e, conseqüentemente, o correto auxílio diagnóstico.

A eletroforese que utiliza como suporte o ágar em pH ácido ou procedimentos assemelhados tem sido realizada apenas em alguns laboratórios e na diferenciação de hemoglobinas que migram na mesma posição em pH alcalino, como é o caso das hemoglobinas S e D e das C e E. Entretanto, na população brasileira, são mais freqüentes as hemoglobinas S e C<sup>(1, 14, 24, 25)</sup>, o que, de uma forma errônea, faz pensar que esse teste não apresenta a validade devida no auxílio diagnóstico laboratorial.

Por sua vez, a técnica da focalização isoeétrica fica na dependência da possibilidade do laboratório em realizar, com segurança, um procedimento que utiliza alta voltagem. Quando possível, essa técnica mostrou ser de fáceis realização e interpretação e com resolução capaz de diferenciar as bandas de cada fenótipo de hemoglobina (Hb) na dependência do ponto isoeétrico (pI) de cada fração, sendo portanto particular e específica. O procedimento representa uma técnica na qual compostos eletroforéticos são fracionados de acordo com os seus pIs através de um gradiente de pH contínuo<sup>(10, 20)</sup>. Contrário à eletroforese de zona, na qual um pH constante do meio de separação estabelece uma densidade de carga constante na superfície da molécula, permitindo uma migração com mobilidade também constante, a carga do composto anfotérico na IEF permanece alterada e diminuindo de acordo com sua curva de titulação, em que ela migra através do gradiente de pH, alcançando sua posição de equilíbrio, ou seja, a região onde o pH iguala-se ao seu pI, estabelecendo a parada da fração analisada<sup>(18, 20, 21)</sup>.

A utilização desse procedimento em triagens de hemoglobinas anormais demonstra ótima resolução, nítida separação das bandas de HbA e HbF e identificação de hemoglobinas variantes e frações menores, como a HbA<sub>2</sub>. Em casos onde frações anormais estão presentes em pequenas quantidades e em sangue de cordão, esta técnica também é muito empregada<sup>(4)</sup>. Devido ao seu alto poder de resolução, a IEF tornou-se a mais promissora e versátil metodologia para o estudo de sistemas polimórficos, incluindo-se as hemoglobinopatias, como também para a descoberta de novas variantes genéticas<sup>(19)</sup>.

Outras vantagens dessa metodologia seriam a possibilidade de utilizar somente uma pequena quantidade de eritrócitos (4µl) e a aplicação de muitas amostras concomitantemente (até 80 amostras). Por outro lado, poder-se-ia obter o hemolisado tanto do sangue total, como de cartões de papel de filtro, como aqueles utilizados para o teste do pezinho. Essas adaptações representariam uma facilidade no caso da realização de triagens dessa patologia, tanto em adultos, quanto em crianças e recém-nascidos.

HEMOGLOBINAS ANORMAIS	ELETROFORESE EM ACETATO DE CELULOSE pH ALCALINO	ELETROFORESE EM ÁGAR CITRATO pH ÁCIDO	FOCALIZAÇÃO ISOELÉTRICA EM GEL DE POLIACRILAMIDA pH 6 - 8 e 7-9
MUTAÇÕES	(-) $\xrightarrow{\hspace{10em}}$ (+) -10,0    -3,2    -1,0    0 PA    A <sub>2</sub> S    F    A C	(-) $\xleftarrow{\hspace{10em}}$ (+) -3,0    0    5,8    10,0 F    A    S    PA    C	(-) $\xrightarrow{\hspace{10em}}$ (+) -16,0    -15,4    -8,4    -3,0    0    1,3 PA    C    A <sub>2</sub> S    F    A    Fac
VARIANTES $\beta$			
S $\beta^6 \text{ glu} \rightarrow \text{val}$			
C $\beta^6 \text{ glu} \rightarrow \text{lys}$			
D Punjab $\beta^{121} \text{ glu} \rightarrow \text{gln}$			
E $\beta^{26} \text{ glu} \rightarrow \text{lys}$			
J Baltimore $\beta^{16} \text{ gly} \rightarrow \text{asp}$			
N Baltimore $\beta^{95} \text{ lys} \rightarrow \text{glu}$			
O Arábica $\beta^{121} \text{ glu} \rightarrow \text{lys}$			
Porto Alegre $\beta^9 \text{ ser} \rightarrow \text{cis}$			
K Woolwich $\beta^{132} \text{ lys} \rightarrow \text{gln}$			
INSTÁVEIS $\beta$			
Rio Claro $\beta^{34} \text{ val} \rightarrow \text{met}$			
Zürich $\beta^{63} \text{ his} \rightarrow \text{arg}$			
Santa Ana $\beta^{88} \text{ leu} \rightarrow \text{pro}$			
Niterói $\beta^{42-44} \text{ phe/glu/ser} \rightarrow 0$			
Köln $\beta^{98} \text{ val} \rightarrow \text{met}$			
Camperdown $\beta^{104} \text{ arg} \rightarrow \text{ser}$			
VARIANTES $\delta$			
A <sub>2</sub> ' (B <sub>2</sub> ) (*) $\delta^{16} \text{ gly} \rightarrow \text{arg}$			

Figura 1

Com essas observações somadas a relatos da literatura e à experiência de outros laboratórios referentes às posições das hemoglobinas, foi possível o estabelecimento de quadros indicativos da posição de migração das hemoglobinopatias observadas na população brasileira, com a possibilidade de seu uso evidenciando a facilidade da utilização dessa técnica por diferentes laboratórios.

### Agradecimentos

Agradecemos o suporte financeiro concedido pela Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista (FCF/UNESP).

HEMOGLOBINAS ANORMAIS	ELETROFORESE EM ACETATO DE CELULOSE pH ALCALINO	ELETROFORESE EM ÁGAR CITRATO pH ÁCIDO	FOCALIZAÇÃO ISOELÉTRICA EM GEL DE POLIACRILAMIDA pH 6 - 8 and 7 - 9
MUTAÇÕES	(-) $\xrightarrow{\hspace{2cm}}$ (+) -10,0    -5,2    -3,0    0 PA    A <sub>2</sub> S    F    A C	(-) $\xleftarrow{\hspace{2cm}}$ (+) -3,0    0    5,8    10,0 F    A    S    PA    C	(-) $\xrightarrow{\hspace{2cm}}$ (+) -16,0    -15,4    -8,4    -3,0    0    1,3 PA    C    A <sub>2</sub> S    F    A    Fac
<b>VARIANTES <math>\alpha</math></b>			
<b>G Philadelphia</b> $\alpha^{68}$ asn $\rightarrow$ lys			
<b>I</b> $\alpha^{16}$ lys $\rightarrow$ glu			
<b>J Oxford</b> $\alpha^{15}$ gly $\rightarrow$ asp			
<b>J Rovigo</b> $\alpha^{53}$ ala $\rightarrow$ asp			
<b>M Boston</b> $\alpha^{58}$ his $\rightarrow$ tir			
<b>INSTÁVEIS <math>\alpha</math></b>			
<b>Hasharon</b> $\alpha^{47}$ asp $\rightarrow$ his			
<b>Stanleyville II</b> $\alpha^{78}$ asn $\rightarrow$ lys			
<b>G Pest</b> $\alpha^{74}$ asp $\rightarrow$ asn			
<b>Kurosaki (*)</b> $\alpha^7$ lys $\rightarrow$ glu			
<b>Westmead</b> $\alpha^{122}$ his $\rightarrow$ gln			
<b>Campinas</b> $\alpha^{26}$ ala $\rightarrow$ val			
<b>TALASSEMIAS <math>\alpha</math></b>			
<b>Constant Spring</b> $\alpha^{142}$ stop $\rightarrow$ gln			
<b>H (**)</b> $\beta^4$			
<b>Bart's (***)</b> $\gamma^4$			
<b>TALASSEMIAS <math>\delta\beta</math></b>			
<b>Lepore</b> Crossing over $\delta\beta$			
<b>Lepore Baltimore</b> $\delta^{50}\beta^{86}$			

Figura 2

## Referências

- ALVARES FILHO, F. et al. Age and racial geographic distribution of S hemoglobin in Brazil. *Sangre*, v. 40, p. 97-102, 1995.
- ARAÚJO, J. T. Geographical distribution and incidence of hemoglobin variants in Brazil. In: Inter American Symposium on Hemoglobins, 1969 I; Caracas. *Genetical, funcional and physical studies of hemoglobin*. Proceedings Basel: Karger; 1971. p. 26-31.
- BASSET, P. et al. Isoelectric focusing of human hemoglobin: its application to screening, to the characterization of 70 variants, and to the study of modified fractions of normal

- hemoglobin. *Blood*, v. 51, n. 5, p. 971-82, 1978.
- 4 BASSET, P.; BRACONNIER, F.; ROSA, J. An update on electrophoretic and chromatographic methods in the diagnosis of hemoglobinopathies. *J Chromatogr*, v. 227, p. 267-304, 1982.
  5. BRASIL CHANNEL. Disponível em: <<http://www.brasilchannel.com.br>>. Acesso em: 18 nov, 2004.
  6. COMPRI, M. B. Community-based programs for hereditary hemoglobinopathies in Brazilian high school students. *Rev Saúde Pública*, v. 30, p. 187-95, 1996.
  - 7 DIEGUES Jr, M. *Etnias e culturas no Brasil*. Rio de Janeiro: Editora Biblioteca do Exército; 1980.
  8. DIEGUES Jr, M. *Imigração, urbanização e industrialização*. Rio de Janeiro: Centro Brasileiro de Pesquisas Educacionais – Instituto Nacional de Estudos Pedagógicos – MEC, 1964.
  9. HONIG, G. R.; ADAMS III, J. G. *Human hemoglobin genetics*. New York: Springer; 1986.
  10. JENKINS, M. A.; RATNAIKE, S. Capillary isoelectric focusing of haemoglobin variants in the clinical laboratory. *Clin Chim Acta*, v. 289, p. 121-32, 1999.
  11. LEHMANN, H.; HUNTSMAN, R. G. *Man's haemoglobins*. Amsterdam: North-Holland Publishing Company; 1974.
  12. MARENGO-ROWE, A. J. Rapid electrophoresis and quantitation of haemoglobin on cellulose acetate. *Am J Clin Pathol*, v. 18, p. 790-92, 1965.
  13. MOREIRA, H. W. et al. Triagem das hemoglobinopatias por isoelétrico focalização. *J Bras Patol*, v. 35, p. 141-45, 1999.
  14. NAOUM, P. C. et al. Hemoglobinas anormais no Brasil. Prevalência e distribuição geográfica. *Rev Bras Patol Clin*, v. 23, p. 68-79, 1987.
  15. RAMALHO, A. S. et al. Hemoglobin screening: response of a Brazilian community to optional programs. *Cad Saúde Pública*, v. 15, p. 591-5, 1999.
  16. RIGHETTI, P. G.; BOSSI, A. Isoelectric focusing in immobilized pH gradients: recent analytical and preparative developments. *Anal Biochem*, v. 247, p. 1-10, 1997.
  17. RIGHETTI, P. G.; BOSSI, A. Isoelectric focusing of proteins and peptides in gel slabs and in capillaries. *Anal Chim Acta*, v. 372, p. 1-19, 1998.
  18. RIGHETTI, P. G. et al. Isoelectric focusing. In: HAMES, B. D.; RICKWOOD, D. *Gel electrophoresis of proteins a practical approach*. Oxford: Oxford University Press; 1990. p. 149-216.
  19. RIGHETTI, P. G. et al. Human globin chain separation by isoelectric focusing. *J Biochem Biophys Meth*, v. 1, p. 45-57, 1979.
  20. RIGHETTI, P. G. Analytical IEF. In: RIGHETTI, P. G. *Isoelectric focusing: theory, methodology and applications*. New York: Elsevier Biomedical Press; 1983. p. 148-267.
  21. SCHNEIDER, R. G. Electrophoretic methods in hemoglobin identifications. *Hemoglobin*, v. 4, p. 521-26, 1980.
  22. SONATI, M. F. et al. Hereditary hemoglobinopathies in a population from southeast Brazil. *Hemoglobin*, v. 20, p. 175-9, 1996.
  23. VELLA, F. Acid agar-gel electrophoresis of human hemoglobins. *Am J Clin Pathol*, v. 49, p. 440-50, 1968.
  24. ZAGO, M. A. et al. Hereditary hemoglobin disorders in a Brazilian population. *Hum Hered*, v. 33, p. 125-9, 1983.
  25. ZAGO, M. A.; FIGUEIREDO, M. S.; OGO, S. H. Bantu beta S cluster haplotype predominates among Brazilian blacks. *Am J Phys Anthropol*, v. 88, p. 295-8, 1992.

**Endereço para correspondência**

Haroldo Wilson Moreira  
 Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de  
 Ciências Farmacêuticas da UNESP  
 Rua Expedicionários do Brasil, 1.621  
 Caixa Postal 502  
 CEP 14801-902 – Araraquara-SP.  
 e-mail: hmoreira@fcar.unesp.br