

LUCIANA DE SOUZA ONDEI

**Perfil eletroforético e cromatográfico das hemoglobinas
"S-like"**

**Dissertação apresentada
para obtenção do Título
de Mestre em Genética**

Orientadora: Profa. Dra. Claudia Regina Bonini Domingos

São José do Rio Preto, 2005

O presente trabalho foi realizado no Departamento de Biologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto, da Universidade Estadual Paulista, sob orientação da Profa. Dra. Claudia Regina Bonini Domingos, com bolsa CAPES.

Ondei, Luciana de Souza.

Perfil eletroforético e cromatográfico das hemoglobinas "S-like" / Luciana de Souza Ondei – São José do Rio Preto : [s.n.], 2005

154 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Claudia Regina Bonini Domingos
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista.

Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Hemoglobinopatia - Diagnóstico de laboratório. 2. Eletroforese. 3. Cromatografia líquida de alta eficiência. 4. Hemoglobina variante. 5. HPLC. I. Bonini-Domingos, Claudia Regina. II. Universidade Estadual Paulista. Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 616.155

LUCIANA DE SOUZA ONDEI

**PERFIL ELETROFORÉTICO E CROMATOGRÁFICO DAS
HEMOGLOBINAS “S-LIKE”**

COMISSÃO JULGADORA

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE

Presidente e Orientador:

2º Examinador

3º Examinador

São José do Rio Preto, ____/____/____.

Dedico

À minha família, em especial aos meus queridos pais Francisco e Edna, ao meu irmão Fernando e minha cunhada Simone.

Ao meu namorado Fabrício.

Agradecimentos

À Profa. Dra. Claudia Regina Bonini Domingos por ter me apresentado o belo mundo das hemoglobinas. Obrigada pelos ensinamentos e amizade.

Aos amigos do Laboratório de Laboratório de Hemoglobinas e Genética das Doenças Hematológicas, àqueles que passaram e aos que continuam compartilhando bons momentos de discussões, aprendizagem e amizade.

Em especial à Paula Juliana Antoniazzi Zamaro pela leitura dos meus trabalhos, com valiosas sugestões, e por tudo que me ensinou.

Ao pessoal do Laboratório de Bioquímica de Macromoléculas da UNESP/IBILCE, em especial ao Prof. Dr. Gustavo O. Bonilla Rodriguez e à Ana Lúcia Ferrarezzi, pelo auxílio nas diferentes fases de desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Carlos Roberto Valêncio e ao Paulo Henrique Mangonaro pelas análises utilizando a ferramenta *datamining* de visualização 3D (*FastMap*).

Ao pessoal do Laboratório de Hematologia da UNESP Campus de Araraquara, em especial ao Prof. Dr. Haroldo W. Moreira e à Débora Barreto Teresa pela atenção, auxílio e pela disponibilidade do laboratório para a realização da focalização isoeletrica em placa de acrilamida.

À BIO-RAD, BIO-OXFORD, pelo fornecimento de equipamentos utilizados em diferentes procedimentos.

À todos os professores, funcionários e companheiros da UNESP/IBILCE que, direta e indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

A todos os meus amigos, sem citar nomes para não correr o risco de esquecer alguém. Adoro todos vocês. Agradeço à Thaís Billalba Carvalho, em especial, por me ajudar a fazer o abstract.

Ao meu querido namorado Fabrício pelo amor, paciência (devo ressaltar que foi muita) e por me proporcionar momentos tão felizes. Sua presença na minha vida foi muito importante para a concretização deste trabalho. Obrigada também pelo auxílio nas análises estatísticas.

À minha família pelo incentivo constante, em especial aos meus pais que são os grandes responsáveis pela minha chegada até aqui, e ao meu irmão Fernando por me proporcionar momentos alegres e descontraídos.

À Deus pela vida e por mais esta conquista.

*"Felicidade é a certeza de que nossa
vida não está se passando inutilmente"*

Érico Veríssimo

Sumário

1 Introdução.....	11
1.1 Hb Normais.....	11
1.2 Hb Anormais.....	14
1.3 Talassemias.....	15
1.4 Hb Variantes.....	16
2 Objetivo.....	25
2.1 Objetivos Específicos.....	30
3 Material e Métodos.....	27
3.1 Casuística.....	27
3.2 Métodos.....	28
3.3 Análises estatísticas.....	45
4 Resultados.....	48
4.1 Valores referenciais de Hb por HPLC.....	48
4.2 Identificação das Hb “S-like”	55
4.3 Perfil eletroforético e cromatográfico das Hb “S-like”	58
4.4 Resumo do perfil eletroforético e cromatográfico das Hb “S-like”..	83
4.5 Estabelecimento de mapas de migração.....	85
4.6 Material ilustrativo e educativo.....	87
5 Discussão.....	89
6 Conclusões.....	101
7 Referências.....	105
8 Anexos.....	116
9 Resumo.....	151
10 Abstract.....	153

Lista de abreviaturas e símbolos

ACB	Solução de Azul Cresil Brilhante
ANOVA	Análise de variância
2,3-BPG	2,3-bifosfoglicerato
DNA	Ácido desoxirribonucléico
Dnase I	Uma das enzimas que quebram as ligações do DNA
EDTA	Ácido etinoadaminotetracético
Hb	Hemoglobina
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Performance
Kb	Kilobases
LHGDH	Laboratório de Hemoglobinas e Genética das Doenças Hematológicas
LCR	Região Controladora do Locus
MANOVA-CVA	Análise canônica multivariada
PI	Ponto isoelétrico
q.s.p.	Quantidade suficiente para
RNA _m	Ácido ribonucléico mensageiro
TEB	Tris-EDTA-Borato

1 Introdução

1 Introdução

1.1 Hemoglobinas normais

A hemoglobina (Hb) é um tetrâmero, com peso molecular de 64.458 Daltons, formada por quatro subunidades (Figura 1). Cada subunidade é composta de duas porções: a globina, fração protéica que varia geneticamente, e o heme, grupo prostético que contém o ferro, o qual se combina com o oxigênio e confere à molécula sua capacidade de transporte de oxigênio dos pulmões para os tecidos e de parte do gás carbônico no sentido inverso. A fração protéica da molécula de Hb é formada por quatro cadeias num total de 574 aminoácidos. Duas delas são constituídas por 141 aminoácidos e são chamadas tipo alfa. As outras duas possuem 146 aminoácidos cada e são denominadas tipo beta (HONIG; ADAMS III, 1986; WEATHERALL; CLEGG, 2001).

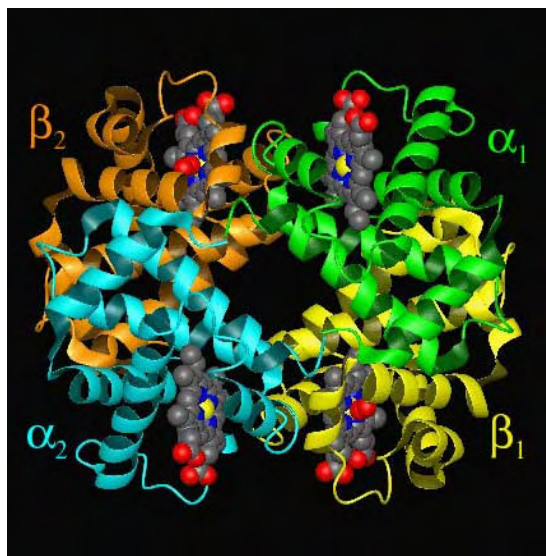


Figura 1: Modelo tridimensional da estrutura quaternária da molécula de Hb (*).

(*) Disponível em <http://mercury.bio.uaf.edu/~kevin_mccracken/lab/lab.html>. Acesso em 22 de julho de 2005.

O complexo gênico da família da globina do tipo alfa, mostrado na Figura 2A, está localizado no braço curto do cromossomo 16 e compreende três genes funcionais denominados zeta 2, alfa 2 e alfa 1, dispostos na ordem de sua ativação durante o desenvolvimento e três pseudogenes (ψ zeta, ψ alfa2, ψ alfa1) (DEVILLE et al., 2004). Os pseudogenes são seqüências de DNA não funcionais que apresentam alto grau de homologia com um gene funcional (STRACHAN; READ, 2002). Outro membro desta família é o gene teta que parece codificar um polipeptídeo que não é incorporado à molécula de Hb e, por isso, a globina teta pode ser desprovida de qualquer função (CLEGG, 1987).

O complexo gênico da família da globina beta, ilustrado na Figura 2B, está agrupado no cromossomo 11 e abrange cinco genes funcionais denominados epsilon, gama alanina, gama glicina, delta e beta, dispostos na sua ordem de ativação e um pseudogene (ψ beta) (HONIG; ADAMS III, 1986; WEATHERALL; CLEGG, 2001; FU; LIU; LIANG, 2002).

Os genes das globinas possuem elementos reguladores que determinam a expressão tecido-específica e dependente das diferentes fases do desenvolvimento. A família gênica da globina alfa possui uma região controladora que se localiza a 40 Kb do gene zeta e denomina-se HS-40. Esta região contém sítios hipersensíveis a Dnase I e sítios de ligação de fatores de transcrição (DEVILLE et al., 2004). A família gênica da globina beta possui uma importante região reguladora denominada Região Controladora do Locus (LCR) que se localiza a aproximadamente 6 a 20 Kb a montante do gene epsilon. A LCR consiste de cinco sítios hipersensíveis a Dnase I e é responsável pelo controle da expressão balanceada dos genes da globina beta e expressão específica dos genes da globina nos eritrócitos (FU; LIU; LIANG, 2002; STAMATOYANNOPOULOS, 2005).

As primeiras Hb sintetizadas são as Hb embrionárias que predominam nos estágios iniciais de gestação. Neste período são encontradas as Hb Gower 1 (constituída por duas cadeias zeta e duas cadeias epsilon), Gower 2 ($\alpha_2\epsilon_2$), Hb Portland I ($\zeta_2\gamma_2$) e Hb Portland II ($\zeta_2\beta_2$). Ao término desse período não ocorre mais a síntese das Hb embrionárias, predominando a produção

da Hb F ($\alpha_2\gamma_2$) que tem início na quarta semana de gestação com aumento progressivo durante o desenvolvimento fetal (WEATHERALL; CLEGG, 2001).

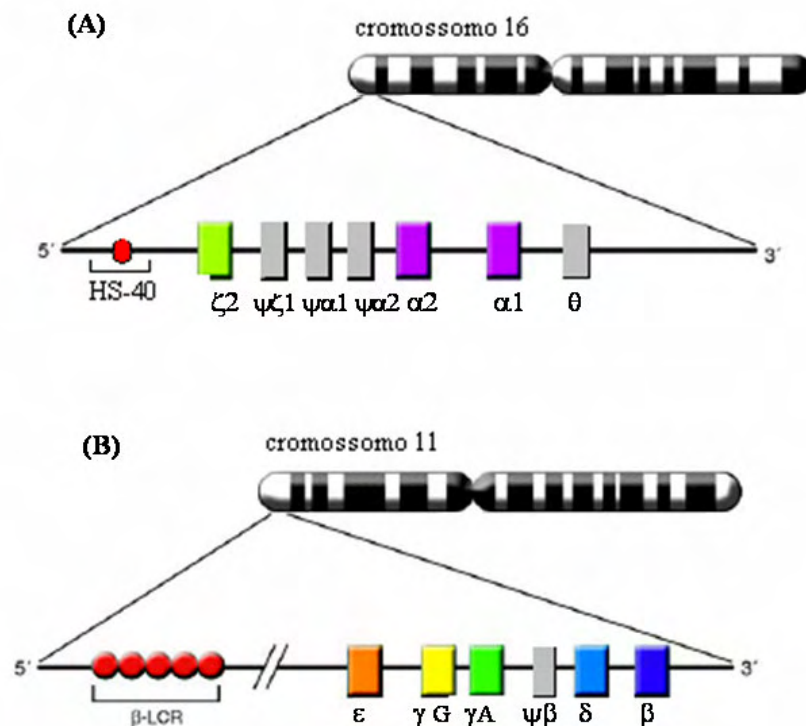


Figura 2: Representação esquemática das famílias gênicas da globina humana. (A) Família gênica da globina alfa incluindo a região controladora HS-40, os genes funcionais zeta2, alfa2, alfa1, os pseudogenes ψ zeta, ψ alfa2, ψ alfa1 e teta. (B) Família gênica da globina beta incluindo a LCR, os genes funcionais epsilon, gama^A, gama^G, delta e beta e o pseudogene ψ beta (BANK, 2005, com modificações).

A Hb A ($\alpha_2\beta_2$) é sintetizada a partir da 10^a semana e se mantém em concentrações próximas a 10% até o nascimento. A Hb A₂ ($\alpha_2\delta_2$) por sua vez, começa a ser sintetizada na 25^a semana em concentrações reduzidas que permanecem até o nascimento, aumentando lentamente até se estabilizarem no sexto mês de vida (HONIG; ADAMS III, 1986; NAOUM, 1997). No indivíduo adulto, os valores normais de Hb A são de 96% a 98%, Hb A₂ de 2,5% a 3,5% e

Hb F de 0% a 1,0% (BONINI-DOMINGOS, 1993). A Figura 3 ilustra as diferentes cadeias polipeptídicas que formam as Hb e os locais de eritropoese durante as fases do desenvolvimento.

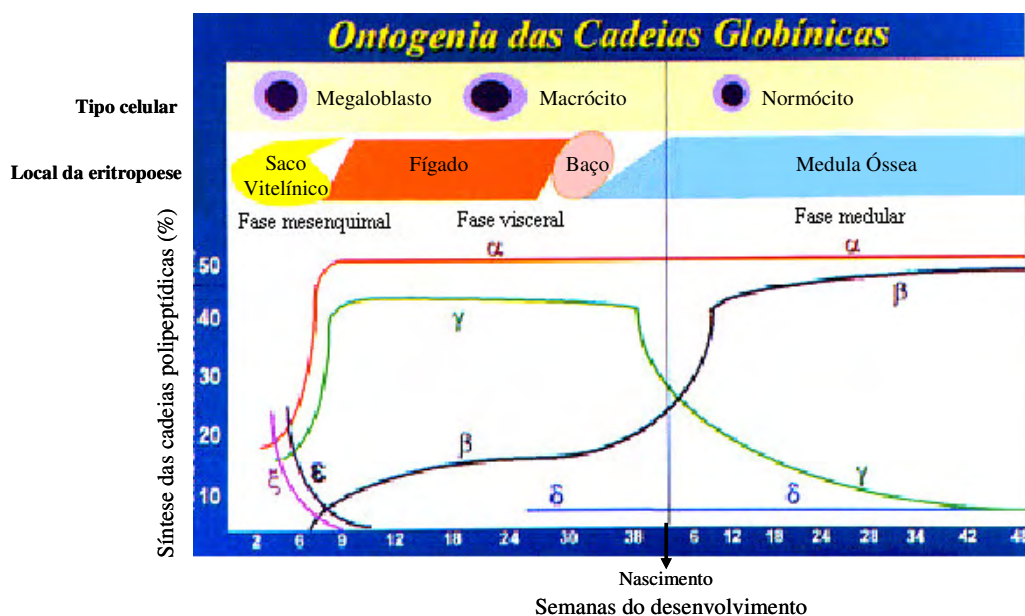


Figura 3: Perfil de produção das cadeias polipeptídicas durante as diferentes fases do desenvolvimento (*).

1.2 Hb Anormais

As hemoglobinopatias podem ser resultantes de mutações que afetam os genes reguladores promovendo um desequilíbrio no conteúdo quantitativo das cadeias polipeptídicas e conseqüentemente nos tipos normais de Hb, causando as talassemias. Também podem ser originadas de alterações envolvendo genes estruturais que promovem a formação de moléculas de Hb com características bioquímicas diferentes das Hb normais, denominadas Hb variantes (BONINI-DOMINGOS, 1993).

(*) Disponível em <<http://info.med.yale.edu/obgyn/reproimmuno/courses/class3/img002.gif>>. Acesso em 22 de julho de 2005.

Mais de 1200 alelos mutantes de Hb foram caracterizados molecularmente, incluindo talassemias e variantes (HUISMAN, 2005). Essas mutações são regionalmente específicas, tendo cada país seu espectro de Hb variantes e mutantes talassêmicos (OLD, 2003).

1.3 Talassemias

As talassemias são caracterizadas por uma redução na produção de uma ou mais cadeias polipeptídicas, que geralmente resultam no desenvolvimento de uma anemia microcítica e hipocrômica. A redução da síntese pode ser total ou parcial e dessa maneira, as talassemias são classificadas segundo a cadeia globínica afetada em: alfa, beta, delta, delta-beta e gama-delta-beta talassemias (BONINI-DOMINGOS, 1993). No Brasil, tanto a alfa quanto a beta talassemias têm alta incidência. Isto se deve à intensa miscigenação da população brasileira com a grande imigração ocorrida no final do século XIX e início do século XX (BONINI-DOMINGOS et al., 2000; ORLANDO; NAOUM; BONINI-DOMINGOS, 2000).

A talassemia alfa é a doença genética mais freqüente no mundo, inclusive na população brasileira, e afeta principalmente grupos de descendência asiática e alguns africanos (BONINI-DOMINGOS, 2004). A principal causa são as deleções que podem remover um gene ou grandes seqüências da família da globina alfa, levando a uma diminuição parcial ou total na síntese da cadeia alfa. As deleções alfa talassêmicas mais comuns são a -alfa^{3.7}, -alfa^{4.2}, --SEA, --FIL, --THAI, --MED e -(alfa)^{20.5} (CHUI; FUCHAROEN; CHAN, 2003). Em um estudo realizado por Wenning et al. (2000) na região sudeste do Brasil, verificou-se que a deleção -alfa^{3.7} foi a mais encontrada nos indivíduos analisados.

A gravidade dos fenótipos talassêmicos depende da extensão da deleção e o quanto o gene afetado contribui para a síntese da cadeia alfa. Como o gene alfa2 produz 2,5 vezes mais RNAm que o gene alfa1, alterações no gene alfa2 terão efeitos fenotípicos mais graves (CHUI; FUCHAROEN; CHAN, 2003).

Nas talassemias alfa, o excesso de cadeias globínicas gama, durante o desenvolvimento fetal, forma a Hb Bart's que é constituída por tetrâmeros de

cadeia gama (gama4) e no adulto, o excesso de cadeia beta forma a Hb H, constituída de tetrâmeros de cadeia beta (beta4). Esses homotetrâmeros, que são relativamente instáveis, podem ser oxidados, formando precipitados intracelulares causando destruição na membrana do eritrócito e fagocitose prematura (CHUI; FUCHAROEN; CHAN, 2003). A frequência da talassemia alfa no Brasil foi por muitos anos subestimada devido à dificuldade de diagnóstico dessa alteração (BONINI-DOMINGOS, 2004).

Nas talassemias beta, as mutações pontuais são as principais causas de redução ou ausência na síntese da cadeia beta (BANK, 2005). Algumas mutações são específicas de determinados grupos étnicos. As mutações predominantes na população da região Mediterrânea, incluindo italianos, espanhóis e portugueses, são comumente encontradas na população brasileira. A mutação CD39 apresenta alta frequência na região sudeste, enquanto na região nordeste a mutação IVS1-6 é a mais encontrada (BONINI-DOMINGOS, 2004).

A talassemia beta apresenta heterogeneidade molecular e expressão fenotípica variável. Na forma homozigota, em que ocorre ausência ou deficiência acentuada na produção de cadeias beta, o acúmulo contínuo das cadeias alfa livres danificam a membrana do eritrócito causando destruição prematura dessas células, que são preferencialmente hemolisadas, levando a uma anemia grave (BANK, 2005). A forma heterozigota é caracterizada por uma anemia mais leve com discreta microcitose e hipocromia e aumento da resistência osmótica dos eritrócitos. Também pode ser verificado aumento dos valores da Hb A2 e em alguns casos, aumento da Hb F (STAMATOYANNOPOULOS et al., 1994).

1.4 Hemoglobinas Variantes

Mais de 900 variantes de Hb já foram descritas até o momento (HUISMAN, 2005). A maioria delas é originada por simples substituições de aminoácidos, resultantes de mudanças nas seqüências de nucleotídeos. As alterações estruturais, com conseqüências nas atividades físico-químicas da molécula, dependem da extensão do processo mutacional e dos locais em que ocorrem. (BONINI-DOMINGOS, 1993; NAOUM, 1997).

As substituições de aminoácidos que ocorrem na porção externa da molécula de Hb, não produzem alterações significativas no comportamento funcional da molécula, com exceção da Hb S. No entanto, as mutações nas porções internas, que envolvem a região em torno do grupo heme, causam instabilidade da molécula de Hb, geralmente iniciada pela oxidação do grupo heme. Outras substituições em resíduos que participam dos contatos $\alpha 1 \beta 1$, das ligações químicas com o 2,3-bifosfoglicerato (2,3-BPG) e do resíduo histidina C-terminal da cadeia beta, provocam a formação de Hb com alterações na afinidade pelo oxigênio. (BONINI-DOMINGOS, 1993). O 2,3-BPG é o principal efetor alostérico, mediador da afinidade da Hb pelo oxigênio (MATHEWS; VAN HOLDE, 1990).

As Hb variantes, baseadas em suas características funcionais, podem ser classificadas em: Hb sem alterações fisiológicas; Hb de agregação como as Hb S e Hb C; Hb instáveis; Hb com alterações funcionais e Hb variantes com fenótipo talassêmico como as Hb Lepore, G-Philadelphia e Hb Hasharon (STAMATOYANNOPOULOS et al., 1994; CHINELATO-FERNANDES, 2003).

Um grande número de Hb variantes tem sido descoberto devido às melhorias nas metodologias de análises. A maioria delas não apresenta alterações fisiológicas em heterozigose, no entanto podem apresentar sintomas graves em homozigose ou quando associadas à outra hemoglobinopatia (WACJMAN et al., 2001).

A Hb S é uma variante de Hb bem caracterizada, que apresenta prevalência variável nas diferentes regiões do Brasil, dependente dos grupos étnicos formadores de cada região (ZAGO; COSTA, 1985). É causada por uma mutação no gene da globina beta, na qual ocorre uma substituição da segunda base nitrogenada do códon GAG para GTG, levando à troca do ácido glutâmico pela valina na posição número seis da cadeia beta. A mudança de um aminoácido com cadeia lateral negativa por um aminoácido com cadeia lateral apolar gera uma diferença na mobilidade eletroforética da Hb S quando comparada com a Hb A (NAOUM, 1997).

Além da diferença na mobilidade eletroforética, a substituição do ácido glutâmico pela valina na porção externa da molécula de Hb favorece a polimerização da Hb S sob condições de baixa concentração de oxigênio, alterando a morfologia do eritrócito para a forma de foice. A alteração celular, causada pelo processo de falcização, influencia intensamente o fluxo sanguíneo aumentando sua viscosidade. Eventualmente pode ocorrer oclusão de capilares devido à deposição de eritrócitos falciformes na superfície endotelial (SCHNOG et al., 2004).

Na herança em heterozigose, traço falciforme, o portador não apresenta alterações hematológicas. No entanto, há relatos de complicações clínicas em portadores expostos a condições de baixa concentração de oxigênio (NAOUM, 1997). Doença falciforme é um termo genérico usado para determinar um grupo de alterações genéticas caracterizadas pelo predomínio de Hb S, incluindo a forma homozigota da Hb S, interações de Hb S com talassemias ou com outras Hb variantes. Essas alterações são caracterizadas por quadros clínicos graves que diminuem a qualidade e a expectativa de vida dos portadores (SCHNOG et al., 2004).

Várias outras Hb variantes foram relatadas na população brasileira. Dentre elas há uma variedade de mutantes “S-like” que apresentam padrão de migração eletroforética semelhante ao da Hb S em pH alcalino, como as Hb D-Los Angeles, Hb D-Iran, Hb Korle-Bu, Hb Hasharon, Hb Queens, Hb Montgomery, Hb Q-India e Hb Lepore. Essas Hb variantes podem ser erroneamente diagnosticadas com o uso de metodologias de diagnóstico pouco eficientes e, conseqüentemente, ter suas frequências subestimadas (ONDEI; ZAMARO; BONINI-DOMINGOS, 2005).

A Hb D-Los Angeles também chamada de Hb D-Punjab é a mais comum das Hb D, sendo originada de uma transversão na primeira base do códon GAA para CAA, no gene da globina beta. Essa alteração resulta na substituição do ácido glutâmico pelo aminoácido glutamina, que contém cadeia lateral polar, na posição 121 da porção externa da cadeia beta globina. Em pH alcalino, a Hb D-Los

Angeles apresenta mobilidade eletroforética semelhante à da Hb S, enquanto que em pH ácido, apresenta migração na posição da Hb A (WAJCMAN et al., 1969).

A Hb D-Los Angeles é encontrada, principalmente, no noroeste da Índia, onde sua frequência é em torno de 3%. Também é encontrada em outras regiões como em populações européias, australianas e da América Latina, apresentando ampla distribuição mundial (WILKINSON et al., 1974; BAIGET; DEL RIO; GIMFERRE, 1982; PEREA et al., 1999).

Quando em heterozigose é assintomática, sendo na maioria das vezes diagnosticada por estudo familiar e em rastreamentos populacionais. Casos de homozigose são raros, podendo apresentar desde parâmetros clínicos e hematológicos normais até uma anemia hemolítica branda (NAOUM, 1997; LEONELI, 2001; CHINELATO-FERNANDES, 2003). Foram relatados homozigotos descendentes de indianos, residentes em Londres, sem nenhum sinal de anemia, com valores de reticulócitos normais e com síntese balanceada das cadeias alfa normal e beta mutante (POLITIS-TSEGOS et al., 1975). Quando há interação entre Hb D-Los Angeles e Hb S são verificados sintomas mais graves, semelhantes aos da Hb S em homozigose. Os portadores de Hb D-Los Angeles associada a talassemia beta apresentam anemia microcítica e hipocrômica que varia de grave a moderada. No Brasil, já foram relatados casos de associação entre Hb D-Los Angeles/Hb S e Hb D-Los Angeles/talassemia beta (ZAGO; COSTA, 1988; NAOUM et al., 2002). Também foi encontrado um caso de associação entre Hb D-Los Angeles e Hb Lepore em que o portador apresentou uma anemia discreta (CHINELATO-FERNANDES, 2003).

Um outro tipo de Hb D foi descrito por Rahbar (1973), com características eletroforéticas idênticas às da Hb D-Los Angeles e denominada Hb D-Iran. Foi encontrada em uma família da parte central do Irã (RAHBAR, 1973). A origem dessa Hb variante é uma transversão na primeira base do códon GAA para CAA, levando a uma substituição do ácido glutâmico pelo aminoácido glutamina na posição 22 da porção externa da cadeia beta globina. Em heterozigose, não apresenta sinais de anemia e a morfologia eritrocitária é normal (HONIG; ADAMS III, 1986; RAHBAR, 1973). No norte da Calábria, na Itália, onde a

incidência desta Hb variante é de 0,4%, foi relatado um caso de associação entre Hb D-Iran e talassemia beta em que o portador apresentou características típicas da beta talassemia heterozigota com valor de Hb A2 acima da normalidade (DE MARCO et al., 1994). Em um caso de Hb D-Iran em homozigose, em uma criança de descendência paquistanesa, foi relatada uma condição relativamente benigna com anemia microcítica, poiquilocitose e hemólise mínima (THORNBURG et al., 2001).

A Hb Korle-Bu é um mutante de cadeia beta que também apresenta padrão eletroforético semelhante ao da Hb D-Los Angeles. A mutação responsável por essa Hb variante é a transição da primeira base do códon GAT para AAT no gene da globina beta, resultando na troca do ácido aspártico, com cadeia lateral negativa, pelo aminoácido asparagina, que contém cadeia lateral polar, na posição 73 da porção externa da cadeia beta globina (ROPERO; VILLEGAS; GONZÁLEZ, 2004).

Em heterozigose, o portador da Hb Korle-Bu não apresenta alterações hematológicas (CHANGTRAKUN et al., 2002). Em homozigose, também não apresenta sinais clínicos; no entanto, a interação entre Hb Korle-Bu e Hb C pode causar anemia hemolítica moderada com presença de células microcítica, hipocrômicas e em alvo (ROPERO; VILLEGAS; GONZÁLEZ, 2004; HUISMAN, 2005). Em um estudo realizado por Changtrakun et al. (2002), foi relatado que a interação entre Hb Korle-Bu, Hb E e alfa talassemia provoca anemia microcítica e hipocrômica moderada. A Hb Korle-Bu é mais freqüente na África, no entanto, também é encontrada em diversas populações devido às correntes migratórias. A sua correta identificação faz-se necessária para um tratamento adequado nos casos mais graves como nas associações com outras hemoglobinopatias (ROPERO; VILLEGAS; GONZÁLEZ, 2004, BONINI-DOMINGOS, 2005).

A Hb Hasharon é um mutante de cadeia alfa que migra em posição semelhante a da Hb S em pH alcalino. É originada de uma transversão na primeira base do códon GAC para CAC no gene alfa2, resultando na substituição do aminoácido ácido aspártico pelo aminoácido histidina na posição 47 da porção

externa da cadeia alfa globina. Apresenta maior ocorrência em italianos, judeus e outras populações do leste europeu (HONIG; ADAMS III, 1986; LEHMAN; VELLA, 1974).

Em heterozigose, não apresenta anormalidades hematológicas, nem alterações na afinidade pelo oxigênio na maioria dos casos. A Hb Hasharon pode apresentar instabilidade aumentada quando comparada com a Hb normal, ocasionando uma anemia hemolítica branda com leve reticulocitose, devido à destruição prematura dos eritrócitos (CHARACHE; MONDZAC; GESSNER, 1969; LEHMAN; VELLA, 1974).

Foi verificada uma diminuição dos sintomas da talassemia em indivíduos com associação entre Hb Hasharon e talassemia beta. Isto se deve à instabilidade da cadeia alfa mutante que é removida mais rapidamente que a cadeia alfa normal, reduzindo o efeito deletério das cadeias em excesso. Também foi observada uma diminuição nos sintomas clínicos em portadores de talassemia beta homozigota e Hb Hasharon (ZAGO; COSTA; BOTTURA, 1982).

A Hb Queens é uma variante de cadeia alfa encontrada principalmente em populações orientais. É originada por uma transversão na segunda base nitrogenada do códon CTG para CGG no gene alfa2 ou alfa1. Essa alteração leva a uma substituição do aminoácido com cadeia lateral apolar, leucina, pelo aminoácido arginina, com cadeia lateral positiva, na posição 34 da cadeia da globina alfa, na região de contato entre as cadeias alfa 1 e beta 1. Em heterozigose, não são verificadas anormalidades hematológicas, porém, a Hb Queens apresenta afinidade pelo oxigênio um pouco aumentada e é relativamente instável quando comparada com a Hb normal (LEE et al., 1992; HUISMAN, 2005).

A Hb Montgomery é uma Hb variante rara, também mutante de cadeia alfa, que foi encontrada, pela primeira vez, durante um programa de rastreamento de Hb anormais no Alabama. É originada por uma transversão na segunda base nitrogenada do códon CTG para CGG no gene alfa2 levando a uma substituição do aminoácido leucina pelo arginina na posição 48 da porção externa da cadeia da alfa globina. Em heterozigose, não foram relatados sintomas clínicos (HONIG;

ADAMS III, 1986; BRIMHALL, 1975). Em um afro-americano portador de Hb S em homozigose, com crises falcêmicas, foi constatada a associação com a Hb Montgomery. Neste caso, verificou-se uma alta concentração de tetrâmeros formados pela cadeia alfa variante e cadeia beta S, mostrando uma estabilidade aumentada da cadeia alfa variante e alta afinidade com a cadeia beta variante (KRAUSS; BURES; KENIMER, 2000).

A Hb Q-India é uma Hb anormal originada por uma transversão na primeira base nitrogenada do códon GAC para CAC no gene alfa1 resultando em uma troca do ácido aspártico pelo aminoácido histidina na posição 75 da porção externa da cadeia alfa globina. É encontrada, principalmente, em populações indianas com prevalência menor que 0,5%. Portadores de Hb Q-India em heterozigose, com e sem associação de beta talassemia, podem apresentar microcitose e anemia leve. Heterozigotos com deficiência de ferro apresentam níveis menores de Hb Q-India, enquanto que a associação com alfa talassemia pode provocar um aumento da Hb variante. A associação com beta talassemia também afeta os valores de Hb Q-India (ABRAHAM et al., 2005; PANIGRAHI, 2005).

A Hb Lepore é uma variante de Hb originada pela fusão dos genes delta e beta após o pareamento desigual dos homólogos na meiose. A globina variante contém uma sequência de aminoácidos idêntica à porção carboxi-terminal da cadeia beta e uma sequência amino-terminal idêntica a da cadeia delta (BAGLIONI, 1962). Foram descritos três tipos de Hb Lepore com diferentes pontos de quebra durante a meiose, distinguíveis por análise molecular: Hb Lepore-Washington-Boston, apresenta ponto de quebra entre os códons 87 e 116 (delta⁸⁷ácido glutâmico-beta¹¹⁶histidina), mutação mais comum com distribuição mundial; Hb Lepore-Baltimore apresenta ponto de quebra entre os códons 50 e 86 (delta⁵⁰serina-beta⁸⁶alanina) e Hb Lepore-Holanda, variante mais rara, apresenta ponto de quebra entre os códons 22 e 50 (delta²²alanina-beta⁵⁰treonina) (RIBEIRO et al., 1997).

Os portadores de Hb Lepore em heterozigose podem apresentar anemia branda com microcitose e hipocromia. Interações com outras Hb variantes podem

produzir fenótipos variáveis. A associação com alfa talassemia não altera a formação da Hb variante, nem o fenótipo (ROPERO et al., 1999; VIPRAKASIT et al., 2002).

Devido à grande diversidade genética da população brasileira, são encontrados vários tipos de Hb variantes. Com a melhoria da qualidade dos testes laboratoriais e implementação de amplos programas de rastreamento, observou-se nos últimos três anos um aumento no número de requisições para esclarecimentos de diagnósticos envolvendo hemoglobinopatias, como observado no Laboratório de Hemoglobinas e Genética das Doenças hematológicas (LHGDH). No entanto, na literatura atualmente disponível, não são encontrados mapas de migração com informações completas e de fácil acesso aos serviços e profissionais de saúde. Além disso, as informações sobre as Hb variantes também estão dispersas, sendo necessário consultar diversas fontes para obter informações sobre os diferentes mutantes.

Dessa forma, objetivou-se estabelecer o perfil eletroforético e cromatográfico das Hb variantes S e “S-like” e o perfil de migração eletroforética das cadeias globínicas em pH alcalino e pH ácido, em amostras de indivíduos normais e portadores de Hb variantes, desenvolvendo material ilustrativo e educativo que servirá de suporte para a identificação dessas Hb variantes na população brasileira, contribuindo para o seu conhecimento.

2 Objetivos

2 Objetivo

Contribuir para o conhecimento das Hb variantes S e “S-like” por análise do comportamento cromatográfico e eletroforético das Hb variantes e das cadeias globínicas do tipo alfa e tipo beta em pH alcalino e pH ácido, determinando o perfil desses mutantes.

2.1 Objetivos Específicos

1. Estabelecer os valores referenciais de Hb, obtidos por HPLC, para adultos normais e portadores de Hb S no Brasil, comparando os diferentes fenótipos encontrados com o auxílio da estatística e informática ^(*)
2. Identificar as variantes de Hb “S-like” pelos métodos clássicos de diagnóstico
3. Identificar as globinas do tipo alfa e tipo beta normais e mutantes, por procedimentos eletroforéticos em pH alcalino e pH ácido
4. Traçar o perfil cromatográfico das Hb “S-like”
5. Estabelecer mapas de migração eletroforética
6. Relacionar os mutantes de globina com os achados laboratoriais clássicos e elaborar material educativo e ilustrativo para cada caso

^(*) Esse objetivo originou um artigo, em anexo, que será submetido à Annals of Clinical & Laboratory Science.

3 Material e Métodos

3 Material e Métodos

3.1 Casuística

Foi avaliado um total de 881 amostras de sangue periférico distribuídas da seguinte forma:

a) Para estabelecer os valores de referência de hemoglobinas por Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC), em adultos portadores de Hb S, foram analisadas 751 amostras de sangue periférico, colhidas com EDTA como anticoagulante, após consentimento informado, de indivíduos com idade acima de um ano, sem distinção de gênero e etnia, provenientes de diferentes localidades. As amostras foram separadas em cinco grupos segundo o fenótipo: com Hb normal (AA); Hb S em heterozigose (AS); Hb S em heterozigose associada à alfa talassemia (ASH); Hb S em homozigose (SS) e duplos heterozigotos para Hb S e Hb C (SC).

Para as análises, foram incluídas aos valores de Hb A0, obtidos pela HPLC, as subfrações de Hb A glicosilada e Hb A acetilada, denominadas “P2” e “P3” respectivamente, no software do equipamento. Para o grupo controle, os valores de Hb A2 considerados normais foram de 2,0% a 3,5% e os de Hb F até 1,3%, fornecidos pelo fabricante e, previamente comparados por outros sistemas de análise para as condições do laboratório. Os valores de Hb A2 considerados para definição do grupo amostral com Hb S foram de até 5,2% para os grupos heterozigotos e de até 5,9% nos grupos com Hb SS e Hb SC, utilizando os limites estabelecidos por Shokrani; Turner; Aguinaga (2000).

b) Nas análises das Hb “S-like” foram utilizadas 130 amostras de sangue periférico colhidas com EDTA, após consentimento informado, provenientes de diferentes localidades, sem distinção de gênero, idade, etnia ou classe social.

Este trabalho é parte integrante do projeto intitulado: Contribuição para o estudo dos defeitos moleculares da hemoglobina humana na população brasileira que apresenta protocolo de aprovação sob o número 07/2003 no Comitê de Ética em Pesquisa da UNESP e número 7790, processo 25000.052632/2003-31 na CONEP.

3.2 Métodos

Foram realizadas as metodologias de triagem para hemoglobinopatias visando caracterização das Hb variantes, as quais serão listadas a seguir. Também foi realizada a análise molecular como suporte na identificação de algumas Hb variantes.

3.2.1 Preparação de hemolisados

Para que as amostras fossem submetidas a procedimentos eletroforéticos e testes bioquímicos as células foram lisadas para a obtenção da solução de Hb utilizando duas metodologias:

- Hemolisado Rápido - com saponina, (NAOUM, 1990)
- Solução de Hb - com clorofórmio, (NAOUM, 1990)

Hemolisado Rápido: com saponina

Reativo hemolisante:

- Saponina P.A.	1 g
- Água destilada	100 mL

Procedimento:

- Em placa de Kline foi colocado 1 volume de sangue com 1 volume de reativo hemolisante, com posterior homogeneização até a hemólise completa da mistura;

- O hemolisado pôde ser utilizado após 5 minutos, e no máximo 4 horas depois da sua preparação.

*Solução de Hb: com Clorofórmio**Procedimento:*

- Para lavar os eritrócitos, centrifugou-se 1mL de sangue colhido com anticoagulante com solução salina a 0,85%, a 1.500 rpm, durante 5 minutos, descartando o sobrenadante. O processo foi realizado três vezes, no mínimo.

- Ao volume de eritrócitos lavados, adicionou-se outro de água destilada, homogeneizando a solução. A seguir, adicionou-se um volume de clorofórmio idêntico ao do hemolisado formado. A mistura foi agitada vigorosamente e centrifugada a 2.000 rpm, por 20 minutos.

- A solução de Hb sobrenadante, ou hemolisado, foi retirada por meio de pipeta Pasteur e transferida para um tubo limpo com identificação da amostra. A concentração do hemolisado em Hb, preparado conforme a metodologia apresentada, variou de 10 a 15 g/dL.

3.2.2 Resistência globular osmótica em solução de NaCl a 0,36 % (SILVESTRONI; BIANCO, 1975)*Princípio:*

Técnica utilizada para detectar talassemias do tipo beta, principalmente na forma heterozigota, pois nesses casos os eritrócitos microcíticos são mais resistentes à hemólise nesta solução. A resistência globular não é específica para talassemia beta heterozigota, já que resultados positivos são encontrados também em anemias carenciais e outras hemoglobinopatias, como nos heterozigotos para Hb C.

Reagentes:

Solução estoque - NaCl a 10% - pH 7,4

- NaCl	9,0 g
- Na ₂ HPO ₄	1,36 g
- NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	0,28 g
- Água destilada q.s.p.	100 mL

Solução de trabalho

- NaCl 10%	36 mL
- Água destilada q.s.p.	1000mL

Procedimento:

Em tubo de hemólise colocou-se 2,0 mL de solução de NaCl a 0,36% e 10 µL de sangue total, agitando por inversão, suavemente. A leitura foi feita após 10 minutos.

Interpretação:

O tubo de hemólise com a amostra na solução de NaCl a 0,36% foi colocado a 2,0 cm de uma folha branca com linhas negras. O teste foi interpretado como positivo quando as linhas negras não foram visualizadas, uma vez a resistência aumentada à hemólise do eritrócito tornou a amostra opaca. As linhas foram facilmente visualizadas em amostras com resistência normal à hemólise.

3.2.3 Análise, a fresco, da morfologia eritrocitária (BONINI-DOMINGOS, 2003)

Os esfregaços sangüíneos, a fresco, foram analisados ao microscópio óptico, quanto ao tamanho, forma e quantidade de Hb nos eritrócitos. Os resultados foram divulgados da seguinte maneira, segundo padronização do LHGDH para cada um dos parâmetros avaliados.

- células normais: (N)
- alterações leves: (N/+)
- alterações discretas: (+)
- alterações de discretas a moderadas: (+/++)
- alterações moderadas: (++)

3.2.4 Eletroforese em pH alcalino (MARENGO; ROWE, 1965)

Princípio:

Técnica utilizada para qualificação e quantificação de Hb normais e grande parte das Hb anormais com mobilidades eletroforéticas diferentes das Hb normais.

Reagentes:

Tampão Tris-EDTA-Borato (TEB), pH 8,6

- Tris hidroximetil aminometano	10,2 g
- Ácido etilenodiaminotetracético	0,6 g
- Ácido Bórico	3,2 g
- Água destilada q.s.p.	1000 mL

Conservado em geladeira

Corante:

Ponceau

- Ponceau S	0,5 g
- Ácido tricloroacético	5,0 g
- Água destilada q.s.p.	100 mL

Solução descorante:

- Ácido acético glacial	100 mL
- Metanol	50 mL
- Água destilada q.s.p.	1000 mL

Procedimento:

- As fitas de acetato de celulose foram embebidas em tampão TEB por 15 minutos no mínimo e 6 horas, no máximo.

- Após serem secas em folhas de papel absorvente, as fitas foram colocadas na cuba de eletroforese contendo o mesmo tampão utilizado para

embeber as fitas, conectando-as com os compartimentos eletrolíticos através de tecido absorvente (*perfex*).

- A solução de Hb foi aplicada a 1,0 cm da extremidade da fita em contato com o pólo negativo.

- As amostras foram submetidas a 300 volts por 30 minutos.

- As frações foram analisadas, primeiramente, sem coloração e, posteriormente, coradas com Ponceau. Para corá-las, as fitas foram colocadas no corante por 5 minutos, e em solução descorante por 30 minutos, com agitação da vasilha.

3.2.5 Transparentização (BONINI-DOMINGOS, 2003)

Realizada para possibilitar a conservação das fitas de acetato de celulose para registros.

Reagentes:

- Metanol P.A.	25 mL
- Solução de Transparentização:	
- Ácido acético glacial	7,0 mL
- Metanol	42,5 mL
- Glicerina	0,5 mL

Procedimento:

- A fita de acetato de celulose foi mergulhada no metanol por no máximo 60 segundos.

- Em seguida, ela foi transferida para a solução de ácido acético:metanol:glicerina por 40 segundos.

- A fita de acetato foi então colocada sobre uma lâmina de vidro e levada à estufa a 60°C para secar por, aproximadamente, 2 minutos.

3.2.6 Eletroforese em pH neutro (DACIE; LEWIS, 1985)

Princípio:

Técnica utilizada para identificação e quantificação das Hb H que apresentam perfil de migração em pH alcalino similar a proteínas plasmáticas.

Reagentes:

Tampão pH neutro

- KH_2PO_4	3,11 g
- Na_2HPO_4	1,66 g
- Água destilada q.s.p.	1000 mL

Conservar em geladeira

Procedimento:

- As fitas de acetato de celulose foram embebidas em tampão neutro por 15 minutos no mínimo e 6 horas, no máximo.
- Após serem secas em folhas de papel absorvente, as fitas foram colocadas na cuba de eletroforese contendo o mesmo tampão utilizado para embeber as fitas, conectando-as com os compartimentos eletrolíticos através de tecido absorvente (*perfex*).
- A solução de Hb foi aplicada a 1,0 cm da extremidade da fita em contato com o pólo negativo.
- As amostras foram submetidas a 300 Volts por 30 minutos.
- As frações foram analisadas sem coloração, seguindo mapa específico de identificação.

3.2.7 Eletroforese em pH ácido (VELLA, 1968)

Princípio:

Técnica utilizada para diferenciar alguns tipos de Hb que migram em posições semelhantes na eletroforese em pH alcalino e caracterização semi-quantitativa de Hb F.

Reagentes:

Tampão Fosfato pH 6,2

Para uso nos compartimentos eletrolíticos e confecção do gel:

- Na ₂ HPO ₄	2,02 g
- NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	7,66 g
- Água destilada q.s.p.	1000 mL

Conservar em geladeira

Gel de Ágar-Fosfato

- Ágar-agar	500 mg
- Tampão fosfato pH 6,2	25 mL

Procedimento:

- Os componentes do gel de ágar-fosfato foram adicionados a um erlenmeyer de 250 mL e levados ao forno microondas até completa dissolução, tomando cuidado para a mistura não ferver.

- Foram pipetados 5,0 mL do gel em lâminas de microscópio que gelificaram à temperatura ambiente.

- As amostras foram aplicadas na porção média da lâmina, inserindo o aplicador com cuidado para não partir totalmente o gel.

- Para conexão do gel com os compartimentos eletrolíticos foi utilizado tecido absorvente (*perfex*).

- As amostras foram submetidas a 100 volts por 30 minutos.

- As frações foram analisadas sem corar e coradas com Ponceau.

3.2.8 Pesquisa de corpúsculos de Heinz e agregados de Hb H (PAYANNOPOULOS; STAMATAYANNOPOULOS, 1974)

Princípio:

Os corpúsculos de inclusão de Hb H são formados por cadeias beta oriundas da desnaturação do tetrâmero da Hb. Após coloração esses corpúsculos

apresentam-se dispostos homogeneamente no interior dos eritrócitos como pequenos pontos azulados.

Reagentes:

Solução salina:

- | | |
|-------------------------|--------|
| - Cloreto de sódio | 0,9 g |
| - Água destilada q.s.p. | 100 mL |

Solução citrato:

- | | |
|-------------------------|--------|
| - Citrato de sódio | 2,2 g |
| - Água destilada q.s.p. | 100 mL |

Solução de Azul Cresil Brilhante (ACB):

- | | |
|-------------------------|--------|
| - Azul Cresil Brilhante | 1,0 g |
| - Solução salina | 100 mL |
| - Solução citrato | 25 mL |

Procedimento:

- Em tubo de ensaio pequeno foram colocados 50 µl de sangue total e adicionados 50 µl de ACB.
- Após agitação suave dos tubos, o material foi incubado a 37°C por 30 e 60 minutos.
- Foram feitos esfregaços finos os quais foram examinados ao microscópio em objetiva de imersão.

Interpretação:

Os corpúsculos de Hb H apresentaram-se dispostos homogeneamente no interior dos eritrócitos como fina granulação distribuída homogeneamente, caracterizando um portador de alfa talassemia. Os Corpos de Heinz, provenientes da desnaturação de Hb, apareceram como uma precipitação grosseira junto à membrana dos eritrócitos.

3.2.9 Eletroforese de cadeias polipeptídicas em pH alcalino segundo Schneider (1974) com modificações (BONINI-DOMINGOS, 2003)

Princípio:

Técnica utilizada para separação eletroforética das cadeias globínicas, sendo possível detectar as cadeias globínicas normais e variantes.

Reagentes:

Tampão Tris-EDTA-Borato pH 8,6

Corante Negro de Amido

Uréia

2-mercaptoetanol

Corante:

Negro de amido

- Negro de amido 10B	0,5 g
- Álcool metílico	45,0 mL
- Ácido acético glacial	5,0 mL
- Água destilada	45,0 mL

Procedimento:

- O tampão foi preparado no dia anterior ao teste misturando 36 g de uréia e 70 mL de tampão Tris-EDTA-Borato pH 8,6 (tampão Tris-uréia), em um "becker". A solução permanecia homogeneizando em temperatura ambiente por no mínimo 12 horas, em agitador magnético, até o momento do uso.

- Para preparar as amostras, adicionou-se em um tubo pequeno 50 µL do tampão Tris-uréia, 50 µL de 2-mercaptoetanol e 50 µL de hemolisado preparado com clorofórmio. As soluções ficaram em repouso por 1 hora à temperatura ambiente.

- Ao tampão Tris-uréia restante, foi adicionado 6,4 mL de 2-mercaptoetanol onde as fitas de acetato de celulose foram embebidas por 1 hora.

- Decorrida 1 hora, as fitas de acetato foram secas em papel absorvente e colocadas na cuba de eletroforese, fazendo conexões com os compartimentos eletrolíticos com papel filtro. O tampão em que as fitas estavam embebidas foi utilizado para a corrida eletroforética.

- As amostras foram aplicadas na porção superior do acetato, próximas ao pólo positivo da cuba, sempre utilizando um padrão de Hb AS.

- As amostras foram submetidas a 110 Volts por 40 minutos e 220 Volts por 20 minutos.

- As frações foram coradas com Negro de Amido por 2 minutos e descoradas com solução descorante até completa visualização das frações. Posteriormente, as fitas foram transparentizadas.

3.2.10 Eletroforese de cadeias polipeptídicas em pH ácido segundo Alter et al. (1980) com modificações (BONINI-DOMINGOS, 2003)

Princípio:

Técnica utilizada para a separação das frações de globinas por suas afinidades diferenciadas em pH ácido. Permite boa visualização das globinas gama.

Reagentes:

Solução estoque de poliacrilamida/bis-acrilamida 60:0,4

- Acrilamida	15 g
- Bis- acrilamida	0,1 g
- H ₂ O q.s.p.	25 mL

Uréia 8M

- Uréia	12 g
- H ₂ O q.s.p	25 mL

2 – Mercaptoetanol 1M

- 2 - Mercaptoetanol	35 µL
- H ₂ O q.s.p.	500 µL

Tampão para Corrida – Ácido acético 5%

- Ácido acético glacial	50 mL
- H ₂ O q.s.p.	1000 mL

Gel de poliacrilamida 12%

- Solução estoque	2,5 mL
- Ácido acético	625 µL
- Uréia 8M	9,375 mL
- Triton X-100	250 µL
- Persulfato de amônio	30 mg
- TEMED	100 µL

Tampão de amostra

- Uréia 8M	1,25 mL
- Ácido acético glacial	1,25 mL
- 2- mercaptoetanol	125 µL
- Pironina Y	1,0 mg

Corante Comassie Blue

- Comassie G ou R 250	0,10 g
- Ácido acético glacial	3,5 mL
- Etanol	25 mL
- H ₂ O q.s.p.	50 mL

- O Comassie foi dissolvido no ácido acético e etanol e, posteriormente, o volume foi completado com água destilada.

Preparação do gel de poliacrilamida:

- Em um béquer, foi misturada a solução estoque de acrilamida-bisacrilamida (60:0,4%), uréia 8M, ácido acético glacial, persulfato de amônio e o TEMED. A solução do gel foi colocada nas placas previamente limpas e montadas utilizando espessadores. Após este procedimento foi introduzido o molde para a formação das canaletas. A polimerização ocorreu em 30 minutos em temperatura aproximada de 30°C.

- Após a polimerização, o gel foi submetido a 200Volts por 1 hora, com tampão ácido acético 5% nos compartimentos eletrolíticos e o pólo positivo no topo. Este procedimento foi realizado para homogeneização do pH entre o gel e o tampão.

- Na segunda corrida, foram aplicados 10 µL de 2 – mercaptoetanol 1M em cada canaleta, previamente secas com papel de filtro, e o gel foi submetido a 150 Volts por 1 hora. O tampão de ácido acético 5% foi trocado.

Preparação da amostra para a terceira corrida:

- Foram centrifugados 100 µL de sangue com solução salina a 0,85%, a 1.500 rpm, durante 5 minutos, descartando o sobrenadante, para lavar os eritrócitos. O procedimento foi repetido, no mínimo, por quatro vezes. Do volume de eritrócitos lavados foram retirados 10 µL de papa de eritrócitos e adicionados 200µL de água destilada para romper os eritrócitos.

- As amostras para aplicação no gel foram preparadas misturando 1,5 µL do hemolisado, descrito acima, com 10 µL do tampão de amostra.

Procedimento:

- Após a realização das pré-corridas, as canaletas foram secas e as amostras aplicadas. O tampão de corrida foi trocado novamente e o gel submetido a 200V e 80mA por 3 horas.

- As frações foram coradas com Comassie Blue por 30 minutos e descoradas com solução descorante até completa visualização das frações.

- Para conservação e registro, o gel foi seco entre duas folhas de papel celofane, sobre uma placa de vidro à temperatura ambiente.

3.2.11 Focalização isoeletrica analítica em placa fina de acrilamida (BASSET et al., 1978)

Princípio:

Técnica simples de eletroforese em gel de poliacrilamida em gradientes de pH, sob voltagem elevada. Método útil para detectar e quantificar as Hb anormais por comparação da posição isoeletrica de um mutante desconhecido com aquela de um mutante de referência, medindo-se a separação relativa das Hb.

Material:

- unidade horizontal para eletroforese e isoeletroenfoque, modelo Multiphor II Pharmacia (18-1018-06)
- fonte para eletroforese, modelo Multidrive XL 3.500 Volts, 400 mA, 200 Watts Pharmacia (18-1013-68)
- circulador termostático (-10 a +90 graus C) modelo MultiTemp II Pharmacia (18-1013-78)
- placas de vidro 260X125X3 mm Pharmacia
- placas de vidro 260X125 mm com espaçador em U de 1,0mm Pharmacia (80-1129-36)
- tiras de papel para eletrólitos Pharmacia
- papel Whatman nº 1
- micropipetas automáticas

Preparo das placas de 260X125X 3mm:

- Sobre uma folha de papel absorvente, foi colocada uma placa de vidro lisa sem espaçador de 260X125X3 mm.
- Foram colocadas duas a três gotas de água sobre a placa de vidro.

- Sobre as gotas de água, foi colocada uma folha de gel bond acompanhada de sua folha de papel protetor.

- Sobre a folha de papel protetora, foi deslizado o roller, deixando escoar o excesso de água, para fixar a folha de gel bond na placa de vidro.

- Em seguida, foi retirada a folha de papel protetora.

- Foi espalhado, com perfex, um pouco de repel silante sobre a placa de vidro com espaçador em U. Após estar seca, foi lavada com água MiliQ através de pisseta e seca em seguida, com papel absorvente. Essa placa de vidro de 260X125X3 mm com espaçador em U foi adaptada sobre o conjunto.

- O conjunto foi, então, fixado com uma garra lateral e duas garras na parte inferior.

Reagentes:

Soluções de eletrólitos:

Solução para o cátodo (soda 1 M)

- NaOH 30% (3 g NaOH em pastilhas/10mL água MiliQ)	6,25 mL
- Água MiliQ	50 mL

Solução para o ânodo (ácido fosfórico 1 M)

- Ácido fosfórico a 85% (frasco mãe nessa concentração)	3,8 mL
- Água MiliQ	50 mL

Solução estoque de acrilamida a 20% preparada a cada 15 dias e conservada em frasco âmbar

- Acrilamida	9,7 g
- Bis- acrilamida	0,3 g
- H ₂ O q.s.p.	50 mL

Persulfato de amônio a 3% - preparado no dia do uso

Ácido tricloroacético a 20%

Preparação do gel de poliacrilamida

Em um erlenmayer de 50 mL, foram adicionados os reagentes na seguinte ordem:

- KCN	12 mg
- Água MiliQ	11,7 mL
- Solução de acrilamida 20%	4,5 mL
- Anfólito pH 6-8	0,9 mL
- Anfólito pH 7-9	1,05 mL

A solução foi degaseificada por 10 minutos e, em seguida, adicionados:

- TEMED	5 a 6 μ L
- Persulfato de amônio 3%	250 μ L

- Após ser misturada suavemente, a solução foi despejada entre as placas de vidro e o plástico com pipeta de 10mL. O gel permaneceu a temperatura ambiente por 2 horas para polimerização.

- As pinças foram retiradas após o endurecimento e o gel foi conservado a 4°C, em câmara úmida e fechada, até o momento do uso.

Pré-migração

- A placa refrigerante do aparelho de eletroforese foi regulada entre 5° e 6° através do circulador termostático.

- Sobre a placa refrigeradora, foi colocado um pouco de água com o propósito de aderir a placa de gel bond com o gel de poliacrilamida.

- A placa de gel bond contendo o gel de poliacrilamida foi deslizada sobre a placa refrigerante evitando qualquer rasgo, deformação do gel e formação de bolhas.

- As bordas próximas ao gel foram secas, cuidadosamente.

- Foram depositadas 2 tiras de papel para as soluções de eletrólitos, uma distante da outra, sobre uma placa de vidro, de forma que elas tivessem larguras iguais as do gel.

- Uma das tiras foi umidificada com ácido fosfórico 1 M e depositada no ânodo (+)

- A outra tira foi umidificada com NaOH 1 M e depositada no cátodo (-)

- O gel foi pré-focalizado por 10 minutos em 15 a 16 Watts. A amperagem foi limitada em 20mA e a voltagem em 1500Volts.

Preparação das amostras

- Foram utilizados hemolisados preparados com clorofórmio, previamente armazenados a -20°C. Como essas amostras estavam guardadas por um longo período de tempo, de 2 meses a 2 anos, foi verificada a formação de meta-hemoglobina. Para reduzir a meta-hemoglobina foram adicionados cerca de 15 mg de ditionito a cada 200 µL de hemolisado e passados em uma coluna G10 com água MiliQ para separação da amostra sem meta-hemoglobina, a qual foi estabilizada com monóxido de carbono.

Aplicação:

- Foram depositados 3 µL do hemolisado em papéis Whatman 3MM de 3X3 mm, com ajuda de micropipeta. Os papéis foram interligados um ao outro por meio de fita adesiva para facilitar a aplicação no gel, deixando espaços entre os papéis para evitar contaminação das amostras.

- O depósito foi feito perto de 1cm do cátodo.

Migração:

- Foi aplicada uma corrente constante de 16 Watts com limite de voltagem em 1600 Volts e amperagem máxima.

- A migração durou em torno de 1 hora, até que as frações apresentassem separação consideravelmente boa.

Fixação:

- O gel foi colocado em um recipiente fundo e coberto com solução de ácido tricloroacético a 20% por 10 minutos.
- O excesso de ácido tricloroacético foi retirado e o gel foi lavado com água MiliQ em abundância. Posteriormente, foi colocado sobre uma folha de papel Whatman 3MM onde permaneceu a temperatura ambiente até secar totalmente.

Interpretação

- Foram utilizados padrões com Hb AA, Hb AS e Hb AC para comparação da posição das diferentes frações de Hb.

3.2.12 Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC) (INSTRUCTION MANUAL OF BIO-RAD, 1999)*Princípio:*

O equipamento utilizado foi o VARIANT da BIO-RAD com Kit de análise Beta Talassemia Heterozigota. A HPLC neste equipamento consiste da cromatografia de troca iônica em um sistema fechado, no qual duas bombas de êmbolo duplo e uma mistura de tampões de diluição, com controles de gradientes pré-programados, passam pela coluna detectando as alterações de absorbância a 415 nm. O filtro secundário de 690 nm corrige a linha de base para efeitos provocados pela mistura de tampões com forças iônicas diferentes (Eastman et al., 1996). As mudanças na absorbância são monitoradas e exibidas como um cromatograma da absorbância versus tempo. Os dados de análise provenientes do detector são processados por um integrador embutido e impressos no relatório da amostra de acordo com o tempo de retenção. O tempo de retenção é o tempo transcorrido entre a injeção da amostra até o ápice do pico da Hb. Cada Hb tem um tempo de retenção característico. No final da análise da amostra, uma cópia do cromatograma e os dados do relatório são automaticamente impressos.

Procedimento:

Para Kit Beta Talassemia Heterozigota:

Em um tubo, foram misturados 5 µL de sangue total com 1,0 mL de solução hemolisante fornecida no kit de análise.

Após a hemólise total, as amostras foram acondicionadas nos recipientes adequados e alojadas no equipamento para realização dos procedimentos de leitura das amostras pré-programados.

Interpretação:

A quantificação das diferentes frações de Hb em uma amostra foi realizada a partir dos valores de porcentagem e tempo de retenção comparados com os valores de calibração específicos fornecidos pelo fabricante e emitidos em modelo próprio que incluiu valores numéricos e perfil cromatográfico. Aos valores de Hb A0 obtidos pela HPLC foram incluídas as subfrações de Hb A glicosilada e Hb A acetilada, denominadas P2 e P3 respectivamente, pelo aparelho. Os valores de Hb A2 considerados normais foram de 2,0 a 3,5% e os de Hb F até 1,3%, previamente estabelecidos e fornecidos pelo fabricante.

3.2.13 Análise molecular

Para a análise molecular, realizada como suporte ao diagnóstico clássico, o DNA foi obtido dos glóbulos brancos pelo método de extração fenólica (PENA et al., 1991), seguida de amplificação dos segmentos específicos para Hb D-Los Angeles e Hb Hasharon e digestão enzimática, para verificação dos polimorfismos de tamanhos de fragmentos (CHINELATO-FERNANDES, 2003).

3.3 Análises estatísticas

Nas análises dos valores de Hb, obtidos por HPLC, nas amostras com Hb normais e Hb S foram utilizados testes estatísticos descritivos e inferenciais. A estatística descritiva dos grupos, considerando todos os valores de Hb em conjunto, foi realizada pela análise canônica multivariada (MANOVA-CVA). Esse teste produz uma representação das amostras de cada grupo em um gráfico

sobre dois eixos, permitindo uma análise exploratória (REIS et al., 1990). Também foi aplicada uma ferramenta *datamining* de visualização 3D (*FastMap*) para detecção de padrões de comportamento dos diferentes fenótipos (TRONCO; VALÊNCIO, 2003).

Para as análises inferenciais, os dados foram testados quanto à normalidade e homocedasticidade. Quando as condições de normalidade e homocedasticidade foram satisfeitas aplicaram-se os testes paramétricos, ANOVA-complementada por Tukey, para comparar três ou mais grupos e Teste t para dois grupos. Quando os dados foram não paramétricos, mesmo após transformação dos valores, foram utilizados os testes não paramétricos de Kruskal-Wallis complementada por Dunn para comparar três ou mais grupos e Mann-Whitney para dois grupos (ZAR, 1999).

Nas análises das Hb “S-like” foram aplicados os testes estatísticos descritivos e inferenciais, segundo as condições já descritas. Foram comparados os valores de Hb e o tempo de retenção, obtidos pela HPLC, entre as diferentes suspeitas fenotípicas. Não foi realizada a análise multivariada, nem aplicada a ferramenta *datamining* de visualização 3D devido ao pequeno número de amostra em cada conjunto amostral.

4 Resultados

4 Resultados

4.1 Valores referenciais de Hb por HPLC

Foram analisadas 751 amostras de sangue para estabelecimento dos valores referenciais de Hb, para adultos normais e portadores de Hb S. Encontraram-se 482 amostras com fenótipo AA, 136 AS, 106 ASH, 18 SS e nove SC. O grupo de indivíduos normais foi utilizado como controle para o estabelecimento dos valores de normalidade. Todas as amostras com Hb S apresentaram eluição da Hb variante na janela pré-estabelecida de Hb S com tempo de retenção médio de 4,57 min ($\pm 0,028$ min, variando de 4,51 a 4,63).

No grupo AA, a média de Hb A observada foi igual a 96,54% ($\pm 0,64\%$, variando de 95,0 a 98,0); Hb A2 igual a 2,82% ($\pm 0,27\%$, variando de 2,2 a 3,5) e Hb F igual a 0,34% ($\pm 0,31\%$, variando de 0,0 a 1,0), estando todos os valores dentro da faixa esperada.

Para o grupo AS a média de Hb A foi igual a 56,57% ($\pm 2,73\%$, variando de 51,7 a 67,7); Hb A2 igual a 4,30% ($\pm 0,44\%$, variando de 2,9 a 5,2), Hb F igual a 0,50% ($\pm 0,34\%$, variando de 0,0 a 1,3) e Hb S de 38,54% ($\pm 3,01\%$, variando de 27,2 a 43,4).

No grupo ASH, a média de Hb A foi de 58,81% ($\pm 3,75\%$, variando de 52,1 a 68,0); Hb A2 igual a 4,18% ($\pm 0,42\%$, variando de 2,8 a 5,2); Hb F igual a 0,53% ($\pm 0,36\%$, variando de 0,0 a 1,3) e Hb S igual a 36,54% ($\pm 3,76\%$, variando de 26,6 a 43,0).

Nos homozigotos SS a média de Hb A2 foi igual a 3,90% ($\pm 1,14\%$, variando de 0,8 a 5,6); Hb F igual a 15,75% ($\pm 5,27\%$, variando de 7,2 a 23,1) e Hb S igual a 75,13% ($\pm 4,73\%$, variando de 69,3 a 84,8).

Nos duplos heterozigotos SC, a média de Hb A2 foi igual a 4,39% ($\pm 0,59\%$, variando de 3,8 a 5,7); Hb F igual a 1,70% ($\pm 1,72\%$, variando de 0,4 a 5,5%); Hb S igual a 45,65% ($\pm 1,05\%$, variando de 43,8 a 47,1) e Hb C igual a 46,71% ($\pm 1,35\%$, variando de 44,8 a 48,2). Os valores obtidos foram agrupados na Tabela 1 para melhor visualização dos dados.

Tabela 1: Valores percentuais médios das frações de Hb, obtidos por HPLC, no grupo controle e grupos com Hb S.

Fenótipos	Média $\pm$ Desvio padrão (%)				
	Mínimo-Máximo (%)				
AA	AS	ASH	SS	SC	
Hb A	96,47 $\pm$ 0,77	56,57 $\pm$ 2,73	58,81 $\pm$ 3,75	–	–
	93,8-98,2	51,7-67,7	52,1-68,0	–	–
Hb A2	2,81 $\pm$ 0,31	4,30 $\pm$ 0,44	4,18 $\pm$ 0,42	3,90 $\pm$ 1,14	4,39 $\pm$ 0,35
	2,0-3,5	2,9-5,2	2,8-5,2	0,8-5,6	3,8-5,7
Hb F	0,37 $\pm$ 0,35	0,50 $\pm$ 0,34	0,53 $\pm$ 0,36	15,75 $\pm$ 5,27	1,70 $\pm$ 1,72
	0,0-1,3	0,0-1,3	0,0-1,3	7,2-23,1	0,4-5,5
Hb S	–	38,54 $\pm$ 3,01	36,54 $\pm$ 3,76	75,13 $\pm$ 4,73	45,65 $\pm$ 1,05
	–	27,2-43,4	26,6-43,0	69,3-84,8	43,8-47,1

A avaliação exploratória dos valores referenciais utilizando a análise MANOVA-CVA mostrou quatro grupos distintos, com Hb AA, com Hb S em heterozigose (AS e ASH), com Hb S em homozigose e com Hb S associada à Hb C, estando diametralmente opostos em um plano bidimensional. A Figura 4 ilustra essa distribuição. As homozigoses AA e SS localizaram-se em extremos opostos enquanto que as heterozigoses, AS e ASH, apresentaram distribuição intermediária, entre os dois pontos de homozigotos e com sobreposição de valores, evidenciando uma similaridade entre si. Os parâmetros de análise para este procedimento incluíram as frações de Hb A, Hb A2, Hb F e Hb S. Quando se efetuou a observação desses grupos em sistema *datamining*, a imagem gerada, ilustrada na Figura 5, mostrou-se similar às obtidas por MANOVA-CVA, porém, foi possível visualizar uma disposição intermediária do grupo SC entre os heterozigotos AS e ASH e o grupo SS.

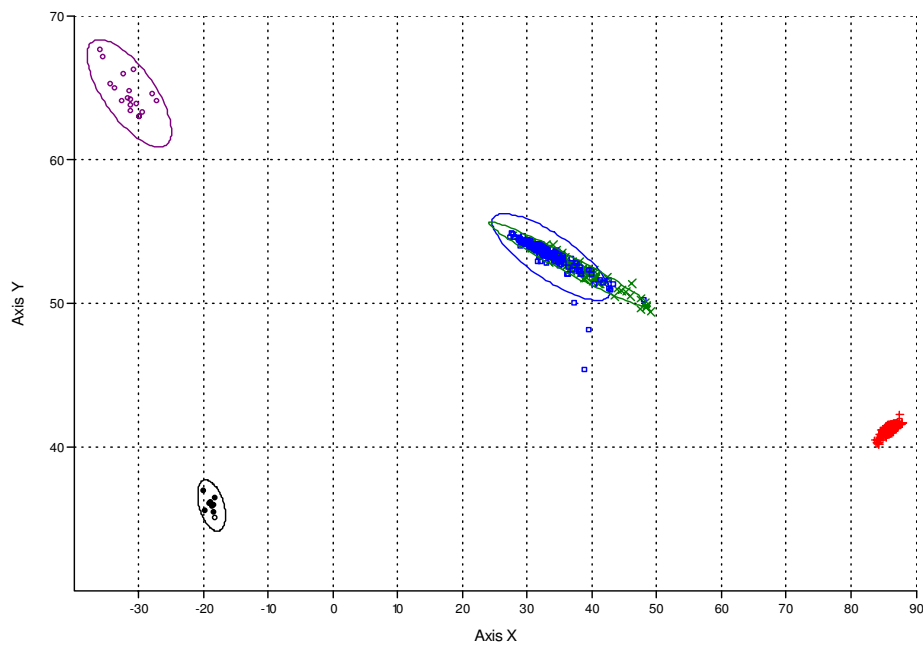


Figura 4: Representação da análise multivariada canônica dos grupos AA (vermelho), AS (azul), ASH (verde), SS (roxo) e SC (preto) considerando valores de HbA, HbA2, HbF e HbS no espaço das variáveis canônicas.

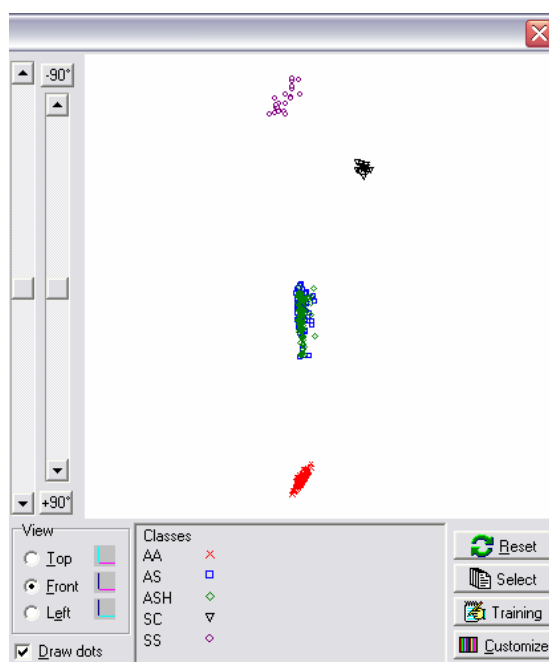


Figura 5: Imagem obtida pelo *FastMap* para os grupos AA (vermelho), AS (azul), ASH (verde), SS (roxo) e SC (preto), incluindo todos os valores percentuais de Hb.

As análises estatísticas demonstraram que todos os grupos com presença de Hb S apresentaram diferença significativa nos valores médios de Hb A, Hb A2 e Hb F quando comparados com o grupo AA ($p < 0,05$), além da fração correspondente à Hb S, variante determinante do fenótipo.

Entre os grupos AS e ASH não houve diferença estatisticamente significativa na comparação das quantidades de Hb A, Hb A2 e Hb F, justificando assim, a sobreposição dos grupos na análise exploratória. Nessa comparação, apenas a quantidade de Hb S diferiu estatisticamente, sendo maior no grupo AS ($p < 0,05$).

Também foram calculadas as razões entre Hb A e Hb S para traçar o perfil das médias dessas Hb. No grupo AS, a razão média encontrada foi igual a 1,48 ($\pm 0,20$, variando de 1,2 a 2,4) a qual foi semelhante a razão de $1,4 \pm 0,2$ encontrada por Roa; Turner; Aguinaga, 1995, em população afro-americana adulta

com Hb S. No grupo ASH a razão igual 1,64 ($\pm 0,30$, variando de 1,2 a 2,6) foi estatisticamente diferente ($p < 0,01$) da razão do grupo AS.

A análise pelo *FastMap* utilizando apenas os valores de Hb A, apresentada na Figura 6, mostrou três grupos dispostos linearmente, com AA em uma das extremidades, com valores estatisticamente diferentes dos demais, um grupo intermediário com AS e ASH com disposição paralela e um grupo com SS e SC na extremidade oposta ao grupo AA. Os valores de Hb A entre AS e ASH não apresentaram diferenças estatisticamente significativas.

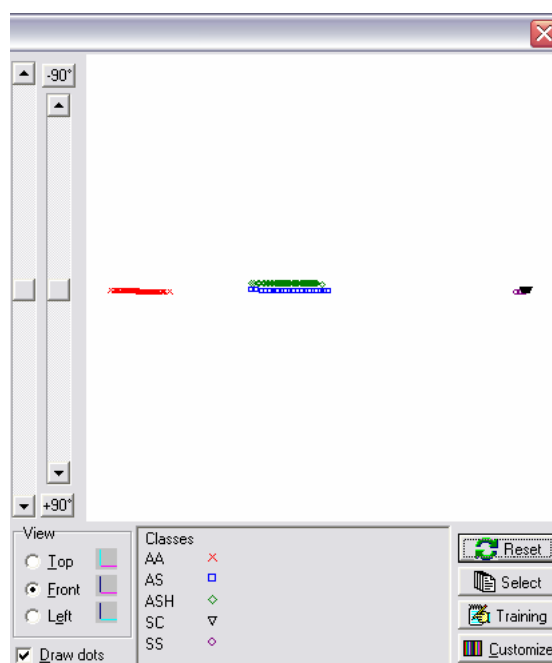


Figura 6: Imagem obtida pelo *FastMap* para os grupos AA (vermelho), AS (azul), ASH (verde), SS (roxo) e SC (preto), incluindo os valores percentuais de Hb A.

A análise dos valores de Hb S apresentou disposição semelhante à dos valores de Hb A, no entanto, o grupo SC apresentou-se paralelamente disposto aos grupos AS e ASH, como visualizado na Figura 7. Os valores de Hb S nos grupos AS, ASH e SC diferiram estatisticamente ($p < 0,05$), embora tenham ocupado uma

mesma disposição espacial. Desta forma, não foi possível inferir com precisão as similaridades entre os grupos apenas pelo padrão de comportamento dos dados gerados pelo *FastMap*.

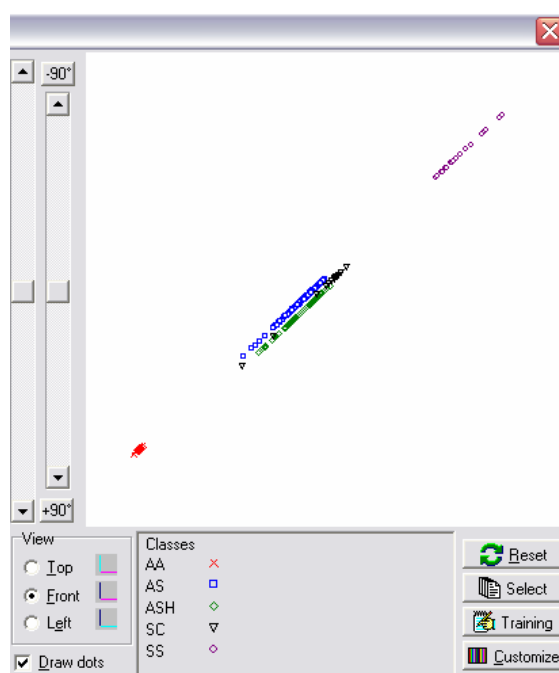


Figura 7: Imagem obtida pelo *FastMap* para os grupos AA (vermelho), AS (azul), ASH (verde), SS (roxo) e SC (preto), incluindo os valores percentuais de Hb S.

A análise dos valores de Hb A2, utilizando o *FastMap* e apresentada na Figura 8 A, mostrou três grupos, o mais externo AA, AS e ASH com distribuição próxima e intermediária e o grupo com SS e SC com valores distantes dos demais. No entanto, com a rotação da imagem, visualizada na Figura 8 B, os grupos com Hb S apresentaram-se dispostos paralelamente e AA continuou como um grupo externo ao plano central. Foi verificado que, nos grupos com Hb S, não houve diferença estatisticamente significativa entre os valores de Hb A2, os quais foram superiores aos esperados para a faixa de normalidade e diferentes do grupo utilizado como controle, justificando a disposição espacial dos grupos.

Para os valores de Hb F, ilustrados na Figura 9, foram observados os grupos AA, AS, ASH e SC dispostos paralelamente e o SS em disposição mais externa no plano, devido principalmente, aos valores de Hb F mais elevados. Os valores de Hb F de todos os grupos com Hb S apresentaram diferença estatisticamente significativa quando comparados aos do grupo AA ($p < 0,05$), e com valores médios maiores que a média normal. Os valores do grupo SS foram maiores que todos os outros grupos e os dos grupos AS, ASH e SC não diferiram entre si.

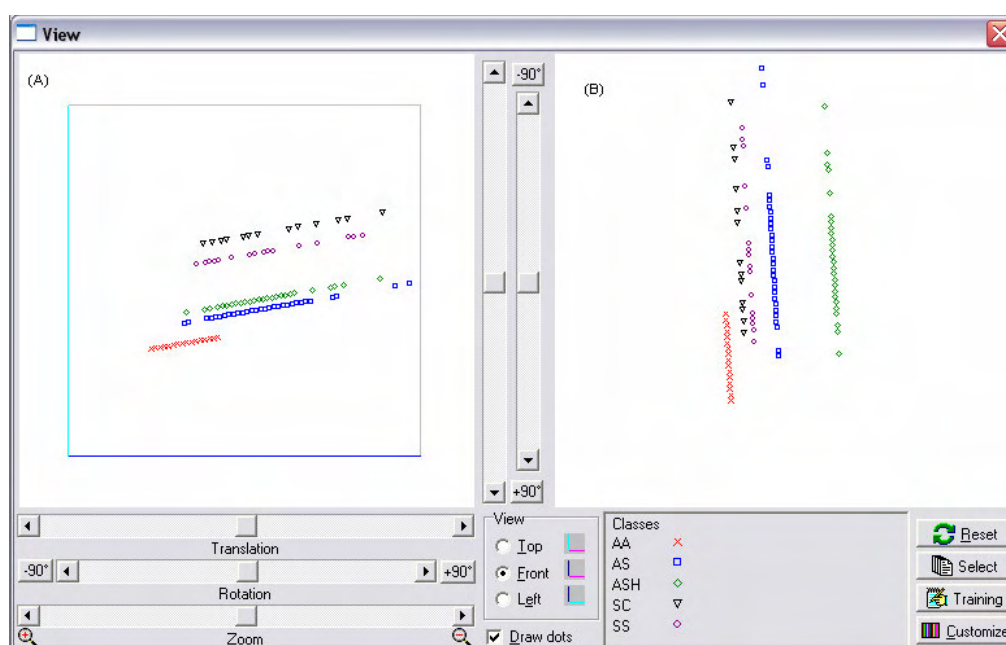


Figura 8: (A) Imagem, dos valores de Hb A2, inicialmente obtida pelo *FastMap* para os grupos AA (vermelho), AS (azul), ASH (verde), SS (roxo) e SC (preto), incluindo os valores percentuais de Hb A2; (B) Imagem com rotação.

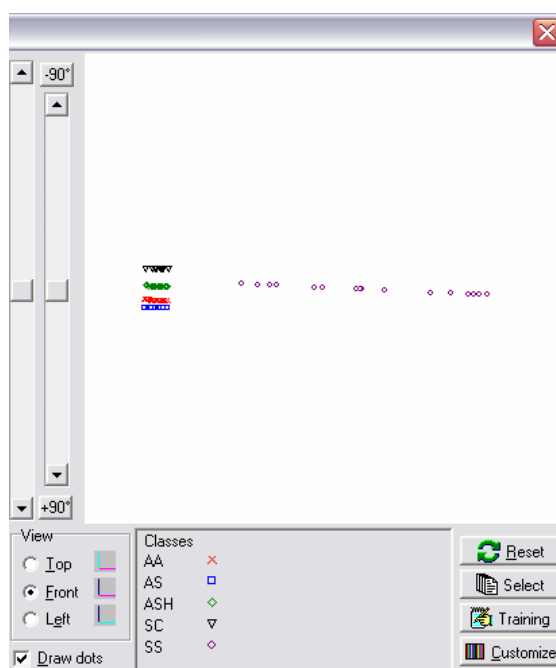


Figura 9: Imagem obtida pelo *FastMap* para os grupos AA (vermelho), AS (azul), ASH (verde), SS (roxo) e SC (preto), incluindo os valores percentuais de Hb F.

4.2 Identificação das Hb “S-like”

No período de março de 2003 a março de 2005 foram encontradas 130 amostras de sangue com Hb variantes que apresentaram perfil de migração eletroforética semelhante ao da Hb S em pH alcalino sendo denominadas Hb “S-like”. Estas amostras foram enviadas ao LHGDH por laboratórios de diferentes estados brasileiros para a realização dos testes de triagem para hemoglobinopatias. A Figura 10 ilustra a distribuição percentual das amostras com Hb “S-like” de cada estado, com destaque para SP com 42% e RS com 26%.

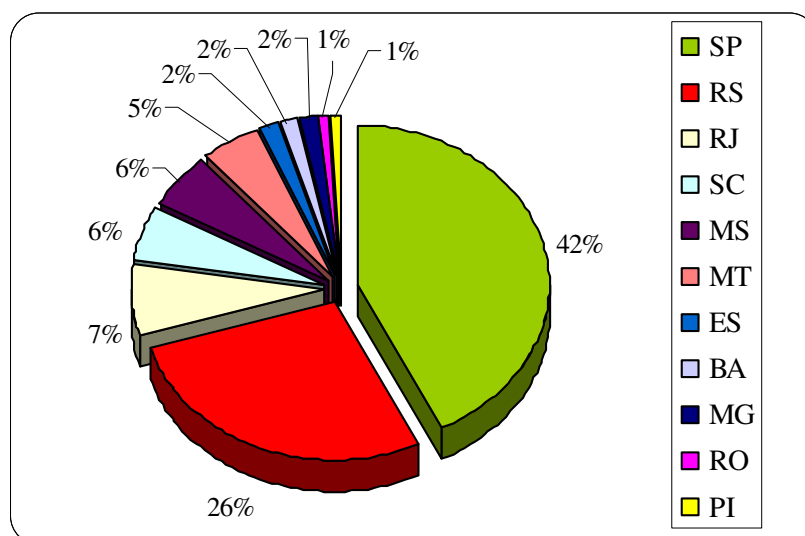


Figura 10: Valores percentuais de amostras enviadas ao LHGDH provenientes de diferentes localidades agrupadas por estados brasileiros.

Nos testes de triagem para hemoglobinopatias foi verificado que 7,7% das amostras com Hb “S-like” apresentaram resultado positivo para resistência globular osmótica em solução de NaCl a 0,36% (RO); 32,3% apresentaram alterações leves (N/+) na análise da morfologia eritrocitária; 46,9% alterações discretas (+); 14,6% alterações de discretas a moderadas (+/++) e 6,2% alterações moderadas (++). Na eletroforese em pH alcalino, todas as amostras apresentaram padrão de migração semelhante ao da Hb S e, na eletroforese em pH ácido, as Hb variantes apresentaram padrões de migração diversos, sendo que 42,3% apresentaram padrão semelhante ao da Hb A. Na eletroforese em pH neutro, 52,3% amostras apresentaram Hb H, das quais 32,3% foram confirmadas na pesquisa de agregados de Hb H com ACB. Foram considerados possíveis portadores de alfa talassemia os que apresentaram resultados positivos em ambos os testes.

As amostras foram submetidas às eletroforeses de cadeias polipeptídicas em pH alcalino e pH ácido para definição da globina alterada. Os perfis de migração das cadeias variantes foram comparados aos dos mapas encontrados na literatura na tentativa de auxiliar a identificação da provável Hb variante. Em pH

ácido, a maioria dos mutantes não apresentou separação além das globinas normais ($\alpha^A \beta^A$), sendo possível detectar as cadeias gama alanina e gama glicina nas amostras que apresentaram Hb F aumentada. Em pH alcalino, foi possível separar a cadeia globínica alterada em todas as amostras. Foram encontrados 46,0% mutantes de cadeia beta, 42,0% de cadeia alfa e 12,0% fusões de cadeia delta/beta.

Devido à dificuldade de identificação das Hb “S-like” apenas com os resultados dos métodos eletroforéticos descritos anteriormente, foi realizada a focalização isoeletrica em placa de acrilamida. No entanto, não foi possível a diferenciação das Hb variantes encontradas, pois as Hb “S-like” possuem padrão de migração muito próximo. Um problema adicional foi observado com a degradação das amostras armazenadas, com formação de subfrações de metahemoglobina.

Os perfis cromatográficos das Hb “S-like” não foram compatíveis com os observados para a Hb S. Foram analisados o tempo de retenção, o valor percentual da Hb variante e o perfil do cromatograma de cada uma das amostras, comparando-os com os dados fornecidos pelo manual de instrução do fabricante da HPLC e dados da literatura, para se chegar a uma suspeita fenotípica. Após a identificação da provável Hb variante, foram analisados os valores percentuais das frações de Hb para cada suspeita de cadeia mutante.

Em cada suspeita foram separados quatro grupos: portador da Hb variante com Hb F dentro dos valores de normalidade; Hb variante associada à alfa talassemia e Hb F dentro da normalidade; Hb variante com valor de Hb F aumentado; Hb variante associada à alfa talassemia e Hb F aumentada. Em muitas amostras o perfil de Hb observado não era compatível com a idade informada e, em outras, as amostras foram enviadas sem essa informação, por isso, as amostras foram separadas segundo os valores de Hb F. A separação das Hb variantes com associação de alfa talassemia foi realizada para averiguar possíveis diferenças nos valores de Hb.

Após a associação dos resultados obtidos pelas análises eletroforéticas e cromatográficas foi possível chegar a uma suspeita fenotípica em 78,0% das

amostras avaliadas. Foram encontrados 21,5% do total de amostras com suspeita de Hb Hasharon, 18,5% de Hb D-Los Angeles, 12,3% de Hb Korle-Bu, 11,7% de Hb Lepore, 7,0% de Hb D-Iran, 2,3% de Hb tipo G, 2,3% de Hb Queens, 0,7% de Hb Montgomery e 0,7% de Hb Q-Índia. Também foram encontrados 1,5% de casos de associação entre dois mutantes de cadeia beta, um com Hb D Los-Angeles associada à Hb S e um com Hb D Los-Angeles associada à Hb Korle-Bu. Nos demais 21,5%, não foi possível identificar a suspeita fenotípica. Na Figura 11 foi ilustrado o número de amostras por suspeita fenotípica.

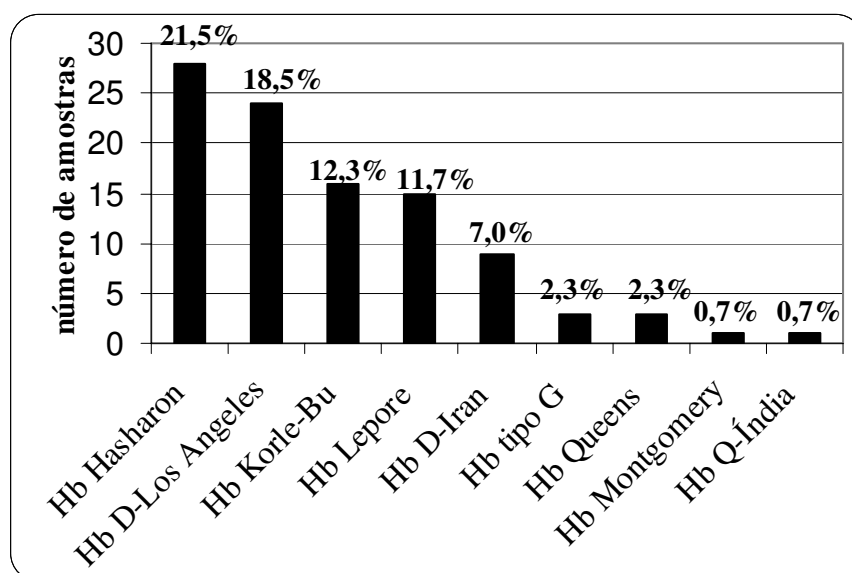


Figura 11: Número de amostras e valor percentual para cada suspeita fenotípica identificada pelos métodos clássicos de análise.

4.3 Perfil eletroforético e cromatográfico das Hb “S-like”

As diferentes Hb variantes foram agrupadas segundo a cadeia globínica alterada identificada por procedimentos eletroforéticos em pH alcalino e pH ácido. Nas Tabelas 2, 3 e 4, em anexo, foram relacionados os resultados da triagem de hemoglobinopatias para os mutantes de cadeia beta, alfa e com fusão das cadeias delta/beta, respectivamente. As Tabelas 5, 6 e 7, em anexo, mostram os valores de

Hb obtidos pela HPLC das amostras com suspeita fenotípica de mutantes de cadeia beta, alfa e fusão das cadeias delta/ beta, respectivamente.

4.3.1 Mutantes de globina beta

As Hb D-Los Angeles, Hb Korle-Bu e Hb D-Iran apresentaram o mesmo padrão eletroforético nos diferentes pH, migrando na posição da Hb S em pH alcalino e na posição da Hb A em pH ácido como pode ser visualizado nas Figuras 12 A, B; 13 A, B e 14 A, B. Também não foi possível diferenciá-las pelas mobilidades eletroforéticas das globinas, pois apresentaram o mesmo perfil de migração em pH alcalino, como pode ser visualizado nas Figuras 12 C; 13 C e 14 C. Em pH ácido, não ocorreu separação das cadeias polipeptídicas variantes, conforme ilustrado em 12 D; 13 D e 14 D, respectivamente.

Na análise cromatográfica, tanto a Hb D-Los Angeles quanto a Hb Korle-Bu apresentaram eluição na janela pré-estabelecida como Hb D no Sistema VARIANT (Figuras 12 E, F e 13 E, F). No entanto, verificou-se que o tempo de retenção médio diferiu entre essas duas variantes, sendo que o tempo médio da Hb D-Los Angeles foi maior que o da Hb Korle-Bu, com diferença estatisticamente significativa ($p < 0,001$). Também se observou que todas as amostras com Hb Korle-Bu apresentaram desvio na linha de base e o valor de Hb A2 foi igual a zero. A Hb D-Iran apresentou um tempo de retenção menor que os das Hb D-Los Angeles e Hb Korle-Bu, com diferença estatisticamente significativa ($p < 0,001$), com co-eluição na janela da Hb A2. Os cromatogramas da Hb D-Iran podem ser visualizados na Figura 14 E, F.

Todas as amostras com eluição na janela de Hb D foram analisadas molecularmente para confirmar ou não a presença da Hb D-Los Angeles. Confirmou-se a presença de Hb D-Los Angeles em heterozigose em 24 do total de amostras. As 16 demais, com desvio na linha de base apresentaram resultados negativos para a Hb D-Los Angeles. Nos dois casos de associação entre mutantes de cadeia beta, também foi confirmada a presença de Hb D-Los Angeles em heterozigose.

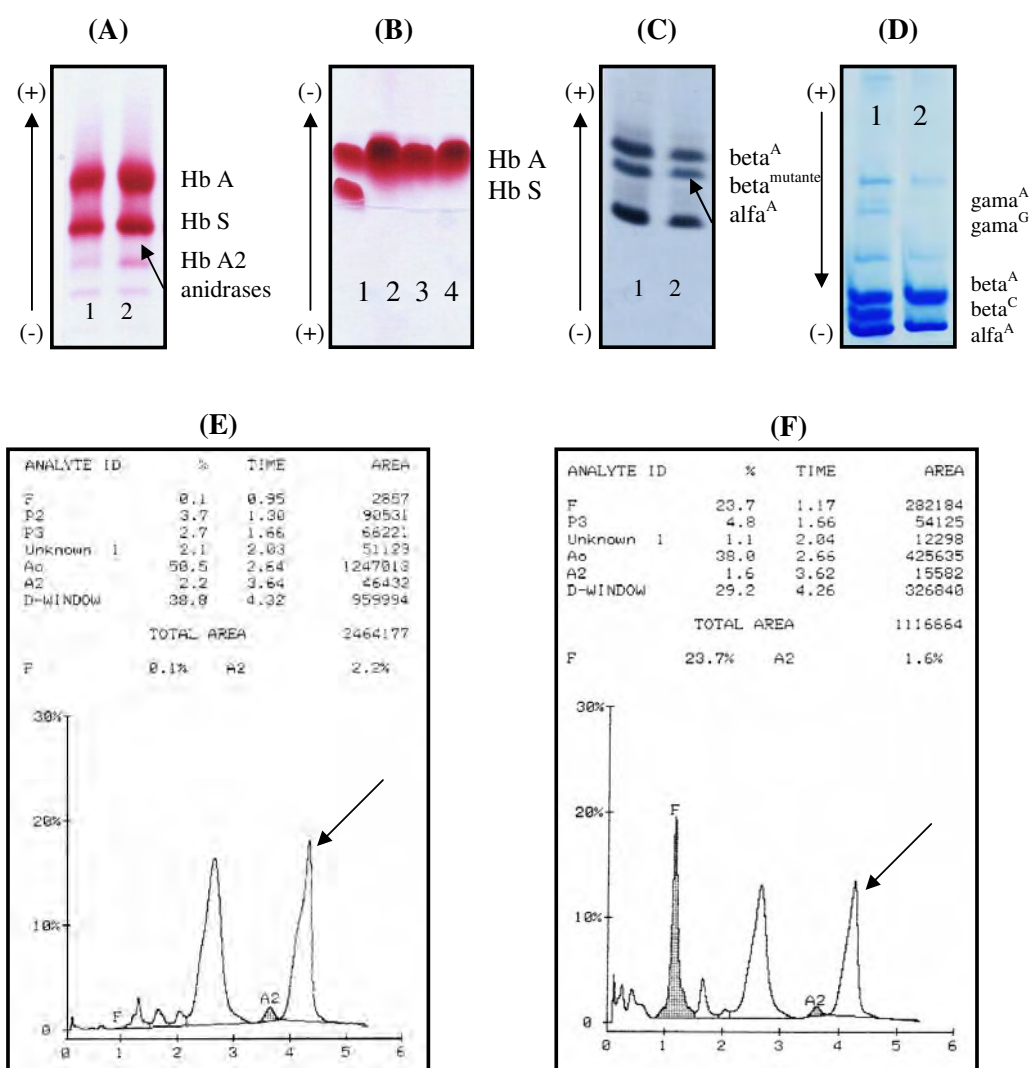


Figura 12: Perfil eletroforético e cromatográfico da Hb D-Los Angeles em heterozigose - **(A)** Eletroforese pH alcalino; 1. padrão Hb AS, 2. Hb AD-Los Angeles; **(B)** Eletroforese pH ácido, amostras 1. padrão Hb AS, 2. 3. e 4. Hb AD-Los Angeles; **(C)** Eletroforese de cadeias, pH alcalino; 1. padrão Hb AS, 2. Hb AD-Los Angeles; **(D)** Eletroforese de cadeias, pH ácido; 1. padrão Hb AC, 2. Hb AD-Los Angeles; **(E)** e **(F)** Cromatogramas obtidos no Sistema VARIANT (Bio-Rad) para as amostras com perfil heterozigoto para Hb D-Los Angeles; **(F)** Amostra com Hb F aumentada. As setas indicam a fração variante.

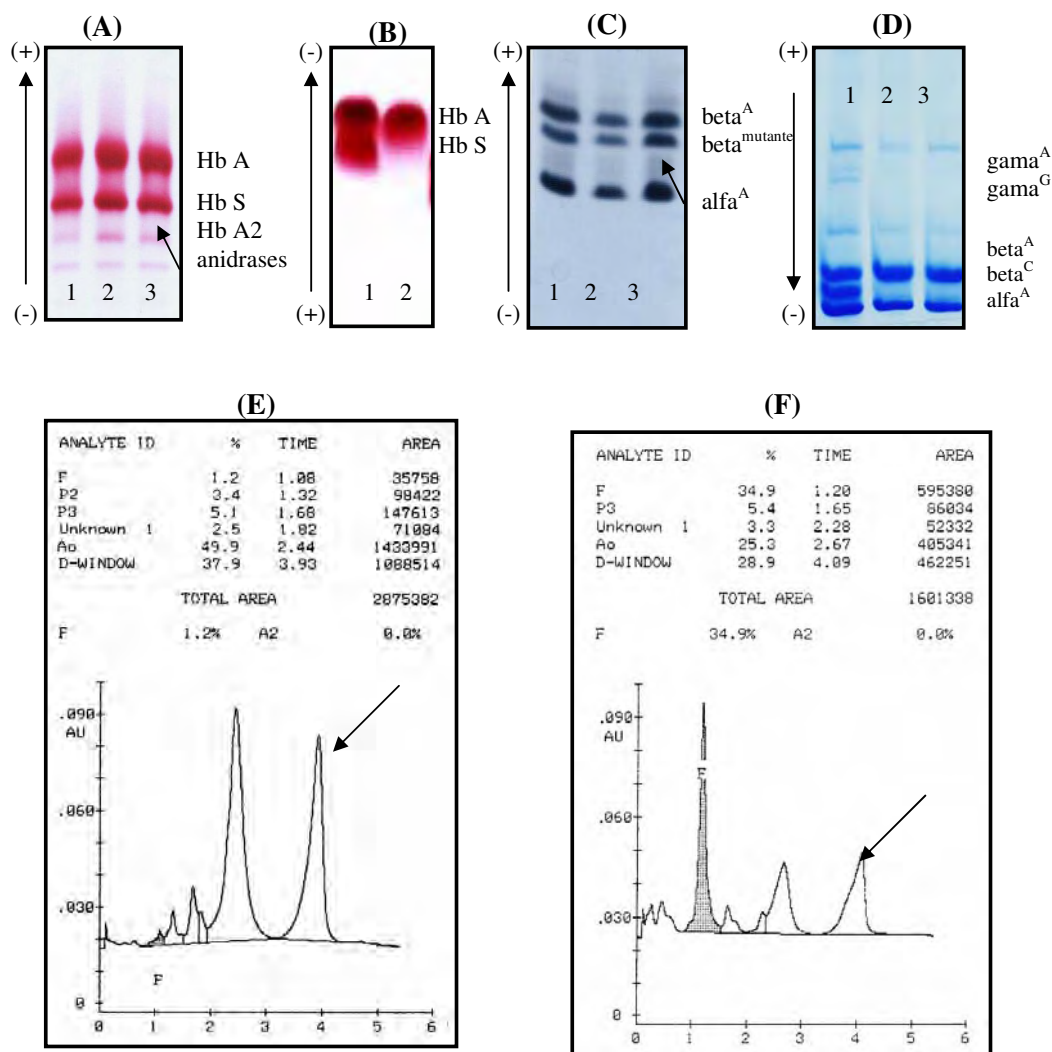


Figura 13: Perfil eletroforético e cromatográfico da Hb Korle-Bu em heterozigose - **(A)** Eletroforese pH alcalino; 1. padrão Hb AS, 2. Hb AD-Los Angeles, 3. Hb Akorle-Bu; **(B)** Eletroforese pH ácido, amostras 1. padrão Hb AS, 2. Hb AKorle-Bu; **(C)** Eletroforese de cadeias, pH alcalino; 1. padrão Hb AS, 2. Hb AD-Los Angeles, 3. Hb AKorle-Bu; **(D)** Eletroforese de cadeias, pH ácido; 1. padrão Hb AC, 2. Hb AD-Los Angeles, 3. Hb AKorle-Bu; **(E)** e **(F)** Cromatogramas obtidos no Sistema VARIANT (Bio-Rad) para as amostras com perfil heterozigoto para Hb Korle-Bu; **(F)** Amostra com Hb F aumentada. As setas indicam a fração variante.

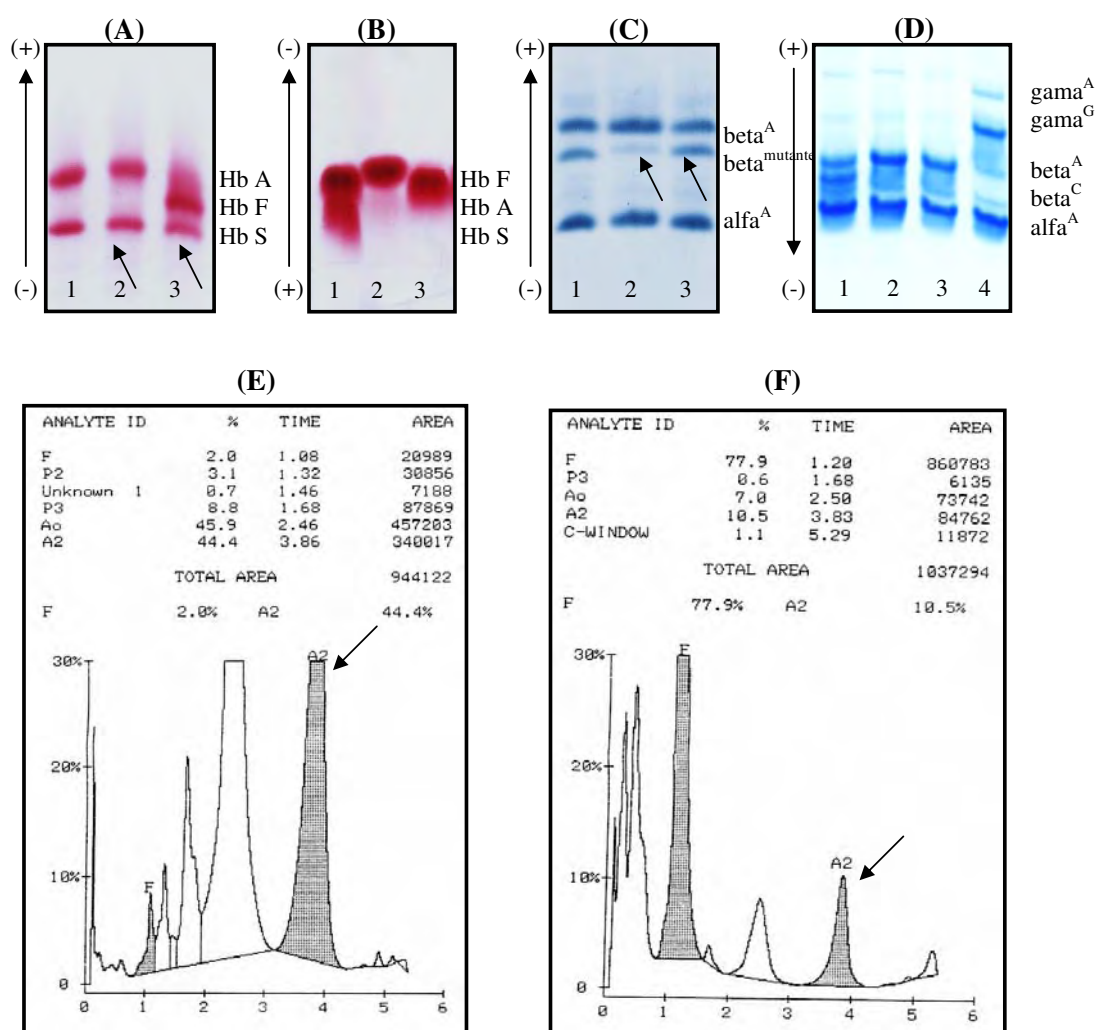


Figura 14: Perfil eletroforético e cromatográfico da Hb D-Iran em heterozigose - **(A)** Eletroforese pH alcalino; 1. padrão Hb AS, 2. Hb AD-Iran, 3. Hb FD-Iran; **(B)** Eletroforese pH ácido, amostras 1. padrão Hb AS, 2. Hb FD-Iran, 3. Hb AD-Iran; **(C)** Eletroforese de cadeias, pH alcalino; 1. padrão Hb AS, 2. Hb FD-Iran, 3. Hb AD-Iran; **(D)** Eletroforese de cadeias, pH ácido; 1. padrão Hb AC, 2. Hb AA, 3. Hb AD-Iran, 4. Hb FD-Iran; **(E)** e **(F)** Cromatogramas obtidos no Sistema VARIANT (Bio-Rad) para as amostras com perfil heterozigoto para Hb D-Iran; **(F)** Amostra com Hb F aumentada. As setas indicam a fração variante.

Nos portadores de Hb D-Los Angeles, cujos valores percentuais médios de Hb estão apresentados na Tabela 8, não houve diferença estatisticamente significativa entre os valores médios de Hb A nos grupos analisados. Já o valor médio de Hb F igual a $5,37\% \pm 3,52\%$ do grupo classificado como “com Hb F acima dos valores de normalidade”, diferiu dos demais ($p < 0,05$). Os valores médios da fração de Hb variante no grupo “AD-Los Angeles” e “AD-Los Angeles associada à alfa talassemia”, não diferiram estatisticamente. Apenas a média do grupo AD-Los Angeles com Hb F aumentada foi menor, com diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

Tabela 8: Valores percentuais médios das frações de Hb, obtidos por HPLC, nos grupos com Hb D Los Angeles em heterozigose.

Fenótipos	Média $\pm$ Desvio padrão (%)			
	Mínimo-Máximo (%)			
	AD-Los Angeles	AD-Los Angeles associada à alfa talassemia	AD-Los Angeles com Hb F aumentada	AD-Los Angeles associada à alfa talassemia e Hb F aumentada
	N=15	N=4	N=4	N=1
Hb A	$60,23 \pm 3,12$ 56,8-66,2	$58,90 \pm 5,05$ 54,3-66,1	$61,27 \pm 3,56$ 57,3-64,8	49,4 –
Hb A2	$1,12 \pm 0,25$ 0,8-1,6	$1,22 \pm 0,26$ 1,0-1,6	$1,10 \pm 0,52$ 0,8-1,7	0,0 –
Hb F	$0,53 \pm 0,34$ 0,0-1,3	$0,35 \pm 0,25$ 0,0-0,6	$5,37 \pm 3,52$ 1,6-8,8	13,1 –
Hb D-Los Angeles	$36,85 \pm 1,87$ 33,3-39,6	$37,17 \pm 3,74$ 32,4-41,5	$31,57 \pm 3,56$ 26,5-34,8	37,5 –

N= número de amostras

O tempo de retenção médio para a fração da Hb D Los-Angeles foi igual a 4,24 min ($\pm 0,05$ min, variando de 4,14 a 4,32). Para calcular a média percentual

de Hb A2 foram desconsideradas sete amostras que apresentaram o cromatograma com desvio na linha de base e os valores de Hb A2 iguais a zero. Estes cromatogramas apresentaram um perfil semelhante ao da Hb Korle-Bu, no entanto, os tempos de retenção que variaram entre 4,14 min e 4,28 min sugeriram Hb D-Los Angeles. Somente pela análise molecular, foi possível confirmar a presença da Hb D-Los Angeles em heterozigose nestas amostras. Todos os valores de Hb A2 encontrados apresentaram-se abaixo dos valores de normalidade, não diferindo entre os grupos.

O resultados eletroforéticos obtidos na interação entre Hb D-Los Angeles e Hb S estão apresentados na Figura 15 A, 15 B, 15 C e 15 D, e a análise cromatográfica observada na Figura 15 E. Foram encontradas as Hb F com valor percentual igual a 2,4%, Hb S igual a 47,9% com tempo de retenção de 4,53 min e a Hb variante com 42,6%, eluída na janela de Hb D, com tempo de retenção igual a 4,22 min. O cromatograma apresentou desvio na linha de base e valor de Hb A2 foi igual a zero.

O resultados eletroforéticos obtidos na interação entre Hb D-Los Angeles e Hb Korle-Bu estão apresentados na Figura 16 A, 16 B, 16 C e 16 D. Na análise cromatográfica foi observada a Hb F igual a 1,1% e a Hb variante igual a 84,1% eluindo na janela de Hb D com tempo de retenção de 4,27 min. O cromatograma, apresentado na Figura 16 E, apresentou desvio na linha de base e valor de Hb A2 igual a zero. Como as duas Hb variantes apresentaram o mesmo perfil eletroforético e cromatográfico a identificação dos mutantes foi realizada por análise molecular.

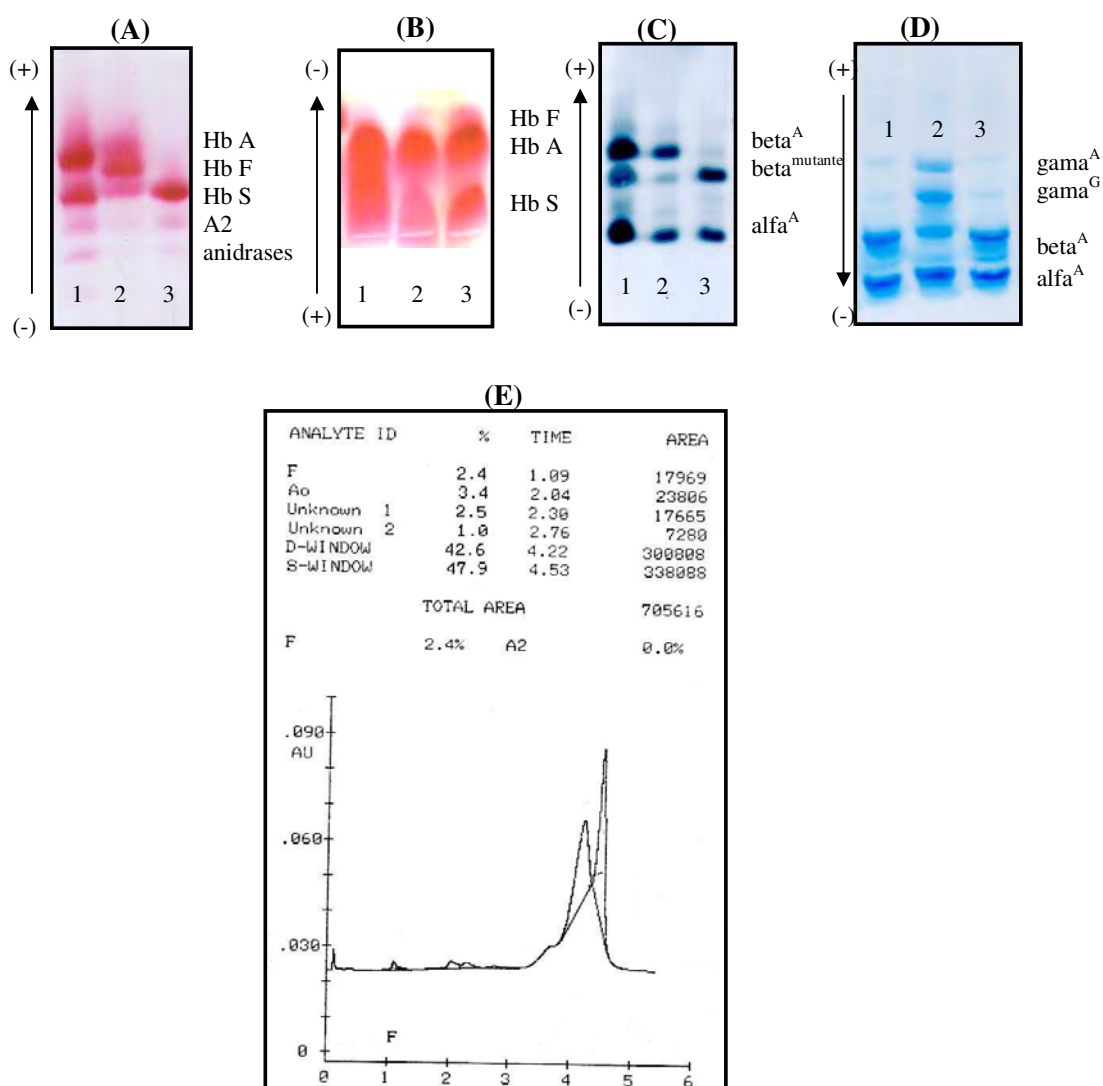


Figura 15: Perfil eletroforético e cromatográfico da interação entre Hb D-Los Angeles e Hb S - **(A)** Eletroforese pH alcalino; 1. padrão Hb AS, 2. Hb FAS e 3. Interação entre Hb D-Los Angeles e Hb S; **(B)** Eletroforese pH ácido, amostras 1. Interação entre Hb D-Los Angeles e Hb S, 2. Hb AHasharon e 3. Hb AS; **(C)** Eletroforese de cadeias, pH alcalino; 1. padrão Hb AS, 2. Hb mutante de cadeia beta e 3. Interação entre Hb D-Los Angeles e Hb S; **(D)** Eletroforese de cadeias, pH ácido; 1. Hb AA, 2. Hb AF, 3. Interação entre Hb D Los Angeles e Hb S; **(E)** Cromatograma obtido no Sistema VARIANT (Bio-Rad) para a amostra com interação entre Hb D-los Angeles e Hb S.

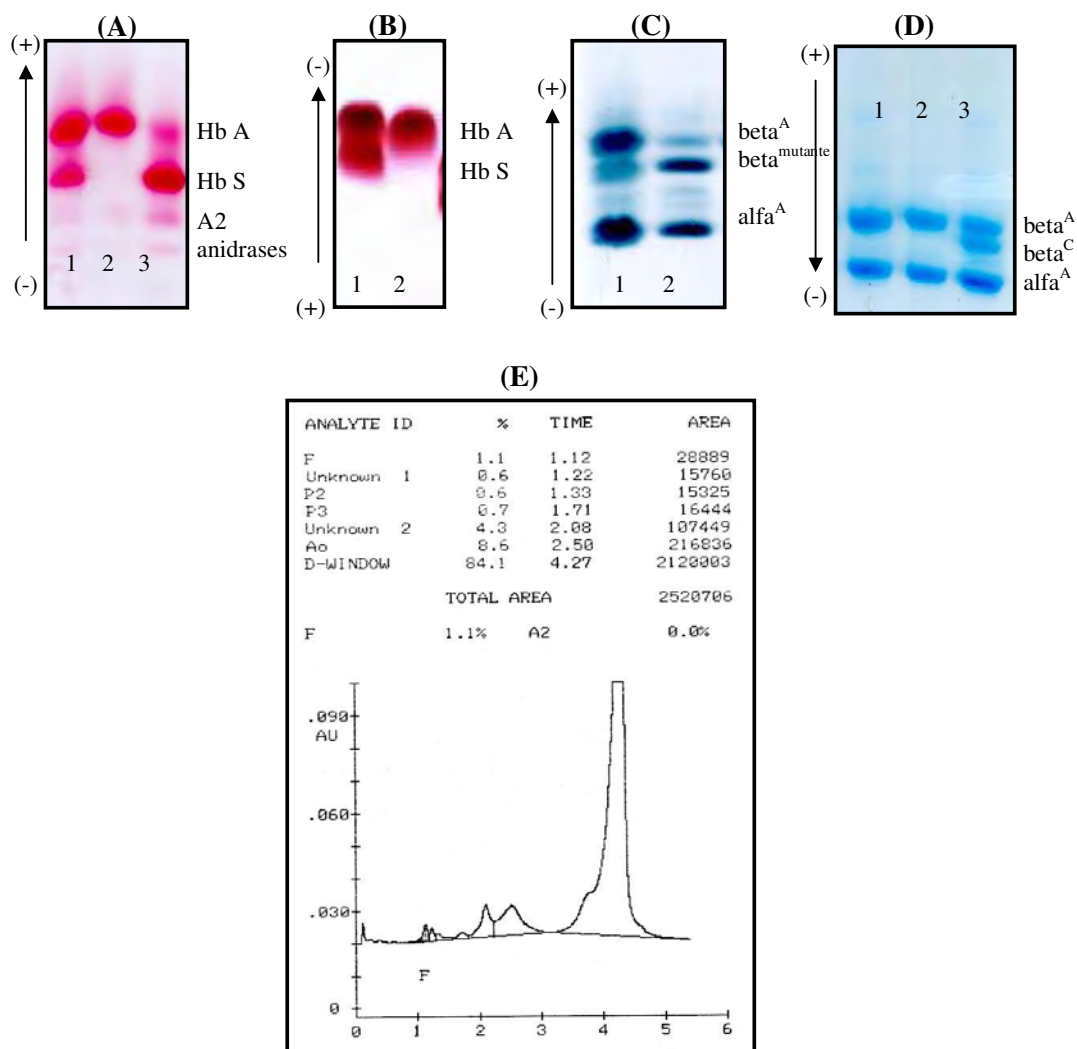


Figura 16: Perfil eletroforético e cromatográfico da interação entre Hb D-Los Angeles e Hb Korle-Bu - (A) Eletroforese pH alcalino; 1. padrão Hb AS, 2. Hb AA e 3. Interação entre Hb D-Los Angeles e Hb-Korle Bu; (B) Eletroforese pH ácido, amostras 1. Hb AS, 2. Interação entre Hb D-Los Angeles e Hb Korle-Bu; (C) Eletroforese de cadeias, pH alcalino; 1. padrão Hb AS, 2. Interação entre Hb D-Los Angeles e Hb S; (D) Eletroforese de cadeias, pH ácido; 1. Interação entre Hb D-Los Angeles e Hb Korle-Bu, 2. Hb AA, 3. Hb AC; (E) Cromatograma obtido no Sistema VARIANT (Bio-Rad) para a amostra com interação entre Hb D-Los Angeles e Hb Korle-Bu.

Os valores percentuais médios de Hb dos portadores de Hb Korle-Bu foram apresentados na Tabela 9. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os valores médios de Hb A nos grupos apresentados. O valor médio de Hb F igual a 26,10% $\pm$ 30,92% no grupo “com Hb F acima dos valores de normalidade” diferiu dos demais ($p<0,05$). Os valores médios da fração de Hb variante do grupo “AKorle-Bu” e “AKorle-Bu associada à alfa talassemia” também não diferiram estatisticamente, apenas a média de 28,0% $\pm$ 5,27% do grupo AKorle-Bu com Hb F aumentada foi menor, com diferença estatisticamente significativa ($p<0,05$).

O tempo de retenção médio para a Hb variante foi igual a 4,05 min ($\pm$ 0,08 min, variando de 3,92 a 4,20) com eluição na janela de Hb D. Os cromatogramas de todas as amostras apresentaram desvio na linha de base e valores de Hb A2 iguais a zero. Três amostras apresentaram tempos de retenção iguais a 4,15 min, 4,16 min e 4,20 min, valores entre o mínimo e máximo da Hb D-Los Angeles. Embora na maioria dos casos o tempo de retenção da Hb Korle-Bu tenha sido menor que o valor mínimo da Hb D-Los Angeles, houve uma sobreposição nos tempos de retenção entre 4,14 min e 4,20 min.

Os valores percentuais médios de Hb dos portadores de Hb D-Iran foram representados na Tabela 10. Não foi possível analisar estatisticamente as diferenças entre os valores devido ao pequeno número de amostras em cada grupo. Também não foi possível quantificar a Hb A2 porque a Hb D-Iran, com tempo de retenção médio igual a 3,80 min ($\pm$ 0,06 min, variando de 3,70 a 3,86), co-elui na janela da Hb A2.

Tabela 9: Valores percentuais médios das frações de Hb, obtidos por HPLC, nos grupos com Hb Korle-Bu em heterozigose.

Fenótipos	Média $\pm$ Desvio padrão (%)			
	Mínimo-Máximo (%)			
	AKorle-Bu	AKorle-Bu associada à alfa talassemia	AKorle-Bu com Hb F aumentada	AKorle-Bu associada à alfa talassemia e Hb F aumentada
	N=6	N=4	N=4	N=2
Hb A	53,88 $\pm$ 6,15 43,1-59,6	55,32 $\pm$ 2,06 54,0-58,4	43,00 $\pm$ 24,85 14,2-67,2	50,15 $\pm$ 10,68 42,6-57,7
Hb A2	0,0 –	0,0 –	0,0 –	0,0 –
Hb F	0,78 $\pm$ 0,31 0,3-1,1	0,92 $\pm$ 0,62 0,0-1,3	26,10 $\pm$ 30,92 1,6-66,1	8,20 $\pm$ 9,33 1,6-14,8
Hb Korle-Bu	41,62 $\pm$ 3,48 38,1-47,5	40,65 $\pm$ 1,98 37,9-42,2	28,00 $\pm$ 5,27 13,4-38,4	33,30 $\pm$ 6,08 29,0-37,6

N= número de amostras

Tabela 10: Valores percentuais médios das frações de Hb, obtidos por HPLC, nos grupos com Hb D Iran em heterozigose.

Fenótipos	Média $\pm$ Desvio padrão (%)			
	Mínimo-Máximo (%)			
	AD-Iran	AD-Iran associada à alfa talassemia	AD-Iran com Hb F aumentada	AD-Iran associada à alfa talassemia e Hb F aumentada
	N=4	N=2	N=1	N=2
Hb A	51,52 $\pm$ 2,09 48,7-53,5	50,80 $\pm$ 1,98 49,4-52,2	14,10 –	32,7 $\pm$ 35,50 7,6-57,8
Hb A2	– –	– –	– –	– –
Hb F	0,87 $\pm$ 0,15 0,8-1,1	0,45 $\pm$ 0,07 0,40-0,50	64,50 –	39,95 $\pm$ 53,67 2,0-77,9
Hb D-Iran	45,12 $\pm$ 4,16 39,2-48,4	48,00 $\pm$ 2,83 46,0-50,0	17,00 –	27,45 $\pm$ 23,97 10,5-44,4

N= número de amostras

Nas amostras com Hb variante mutante de cadeia beta, não foi possível identificar uma suspeita fenotípica em 15% delas. Essas amostras que apresentaram perfis eletroforéticos e cromatográficos diferentes dos conhecidos deverão passar por sequenciamento do DNA, posteriormente.

4.3.2 Mutantes de globina alfa

A Hb Hasharon, em pH alcalino, apresentou padrão de migração na posição da Hb S em 78,6% das amostras e em 21,4%, a migração foi próxima à posição da Hb S, sendo estas amostras de recém-nascidos. Em pH ácido observou-se uma fração na posição da Hb S, podendo a banda estar difusa. As eletroforeses em pH alcalino e pH ácido estão apresentadas na Figura 17 A e B, respectivamente. A cadeia globínica alterada foi visualizada nas eletroforeses tanto em pH alcalino quanto em pH ácido como uma fração abaixo da cadeia alfa normal, como visualizado na Figura 17 C e D.

Os valores percentuais médios da fração variante nos portadores de Hb Hasharon, obtidos pela HPLC, estão destacados na Tabela 11. Foi possível distinguir dois grupos distintos sendo um formado por adultos com Hb F até 1,4% e o outro formado por recém-nascidos com Hb F acima de 43,1%. Cada grupo foi subdividido em portadores de Hb variantes sem associação de alfa talassemia e com associação de alfa talassemia para investigar possíveis diferenças entre os valores de Hb, no entanto, os grupos não diferiram estatisticamente em nenhum valor de Hb. Os grupos com Hb F aumentada apresentaram valores de Hb A2 acima de 13,6% com valores percentuais médios estatisticamente maiores que os dos grupos com Hb F dentro dos valores de normalidade e os valores de Hb A e Hb variante menores ($p < 0,05$). O tempo médio de retenção da Hb Hasharon foi igual a 4,82 min ($\pm 0,02$ min, variando de 4,79 a 4,85), com perfil de pico em agulha e eluição em janela desconhecida, como visualizado na Figura 17 E e F.

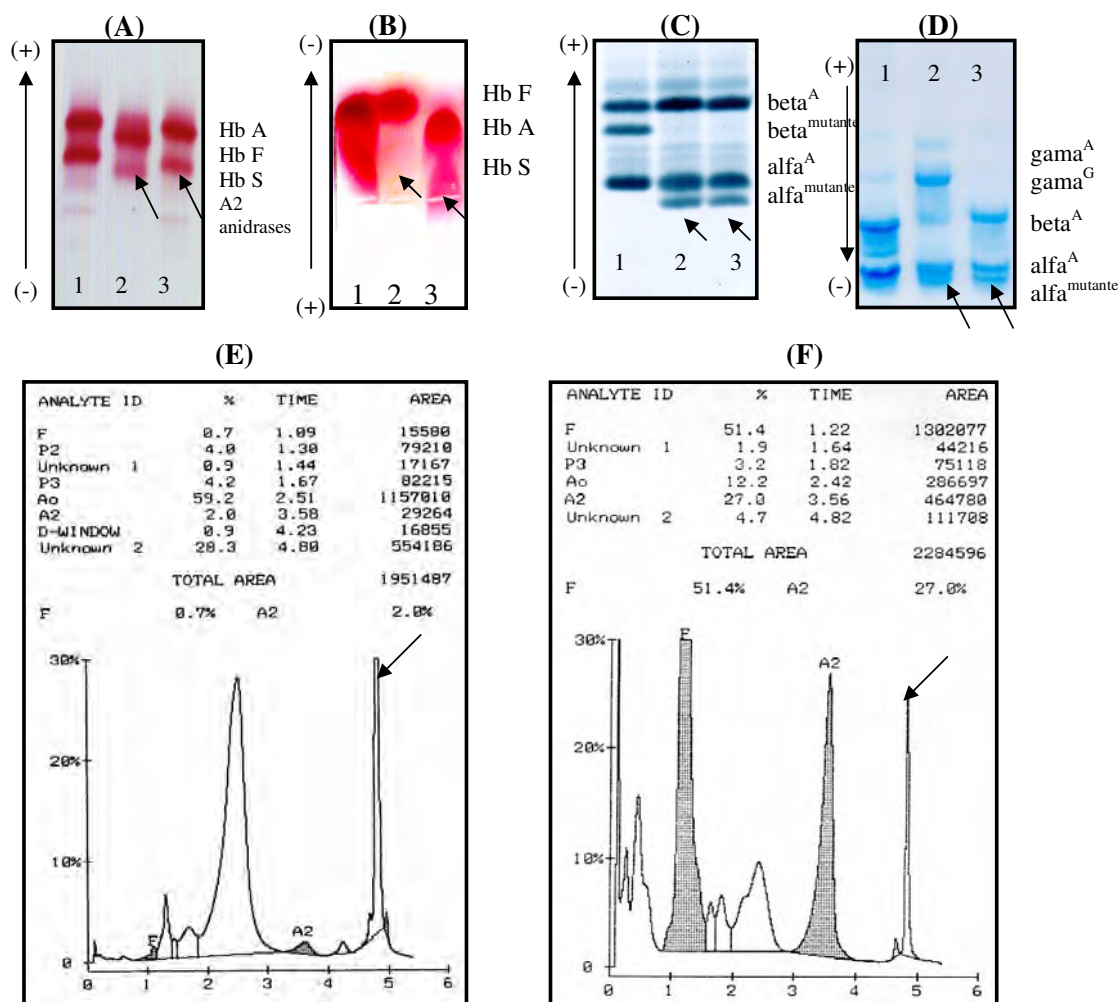


Figura 17: Perfil eletroforético e cromatográfico da Hb Hasharon em heterozigose - (A) Eletroforese pH alcalino; 1. padrão Hb AS, 2. Hb FHasharon, 3. Hb AHasharon; (B) Eletroforese pH ácido, amostras 1. padrão Hb AS, 2. Hb FHasharon, 3. Hb AHasharon; (C) Eletroforese de cadeias, pH alcalino; 1. padrão Hb AS, 2. Hb FHasharon, 3. Hb AHasharon; (D) Eletroforese de cadeias, pH ácido; 1. padrão Hb AA, 2. Hb FHasharon, 3. Hb AHasharon. As setas indicam cadeia alfa mutante; (E) e (F) Cromatogramas obtidos no Sistema VARIANT (Bio-Rad) para as amostras com perfil heterozigoto para Hb Hasharon. (F) Amostra com Hb F aumentada. As setas indicam a fração variante.

Tabela 11: Valores percentuais médios das frações de Hb, obtidos por HPLC, nos grupos com Hb Hasharon em heterozigose.

Fenótipos	Média $\pm$ Desvio padrão (%)			
	Mínimo-Máximo (%)			
	AHasharon	AHasharon associada à alfa talassemia	AHasharon com Hb F aumentada	AHasharon associada à alfa talassemia e Hb F aumentada
	N=11	N=8	N=3	N=6
Hb A	70,36 $\pm$ 3,28 67,0-77,1	68,52 $\pm$ 2,53 64,1-71,5	20,57 $\pm$ 6,95 13,6-27,5	18,43 $\pm$ 4,72 12,3-24,2
Hb A2	2,04 $\pm$ 0,22 1,6-2,5	2,09 $\pm$ 0,18 1,8-2,4	18,63 $\pm$ 4,39 13,6-21,7	18,63 $\pm$ 3,93 13,6-21,7
Hb F	0,44 $\pm$ 0,26 0,0-0,9	0,60 $\pm$ 0,49 0,0-1,4	50,53 $\pm$ 3,30 47,8-54,2	48,60 $\pm$ 4,10 43,1-52,7
Hb Hasharon	25,79 $\pm$ 2,87 20,8-29,6	26,89 $\pm$ 2,41 24,9-31,8	6,20 $\pm$ 1,70 4,3-7,6	6,55 $\pm$ 2,17 4,7-9,6

N= número de amostras

Nas demais suspeitas fenotípicas dos mutantes de cadeia alfa, como as Hb tipo G, Hb Queens, Hb Montgomery e Hb Q-Índia, não foi possível agrupar os valores das frações de Hb para o cálculo dos valores percentuais médios, devido a pouca quantidade de amostras para cada suspeita fenotípica e à variação dos valores dentro de cada grupo. Foi calculada a média apenas para o valor do tempo de retenção.

Nas amostras com suspeita de Hb tipo G verificou-se a Hb variante migrando na posição da Hb S tanto em pH alcalino quanto em pH ácido (Figura 18 A e B). Na eletroforese de cadeias polipeptídicas em pH alcalino, a cadeia variante apresentou uma migração eletroforética abaixo da cadeia alfa normal com disposição próxima à da Hb G-Philadelphia e Hb Hasharon, representada na Figura 18 C. Na eletroforese de cadeias polipeptídicas em pH ácido, Figura 18 D,

foi possível visualizar uma fração difusa abaixo da cadeia alfa a qual não foi possível distinguir como a fração mutante.

O perfil cromatográfico obtido foi semelhante ao sugerido pelo fabricante para a Hb G-Philadelphia, como visualizado na Figura 18 E e F. No entanto, o tempo de retenção foi maior e o perfil de migração da Hb variante em pH ácido diferente da Hb G-Philadelphia, que apresenta padrão de migração na posição da Hb A. Portanto, como não houve uma concordância entre os dados encontrados, foi sugerido como suspeita fenotípica Hb tipo G.

Um dos indivíduos, possível portador de Hb G associada a alfa talassemia, apresentou Hb A igual a 72,7%, Hb A2 igual a 0,7% e Hb F igual a 0,2%. A Hb variante com 26,2% eluiu em janela de Hb S com tempo de retenção igual a 4,40 min. Seu filho apresentou Hb A igual a 47,2% e Hb F igual a 38,0%. A Hb variante com 11,5% eluiu em janela de Hb D com tempo de retenção igual a 4,28 min. O cromatograma apresentou desvio na linha de base e o valor de Hb A2 igual a zero.

O terceiro indivíduo com Hb variante sugestiva de Hb G apresentou Hb A igual a 33,3% e Hb F igual a 36,0%. A Hb variante com 13,5% eluiu em janela de Hb S com tempo de retenção igual a 4,36 min. Seu cromatograma também apresentou desvio na linha de base e o valor de Hb A2 igual a zero. A média do tempo de retenção encontrada para a Hb tipo G foi de 4,35 min ($\pm 0,06$ min, variando de 4,28 a 4,40).

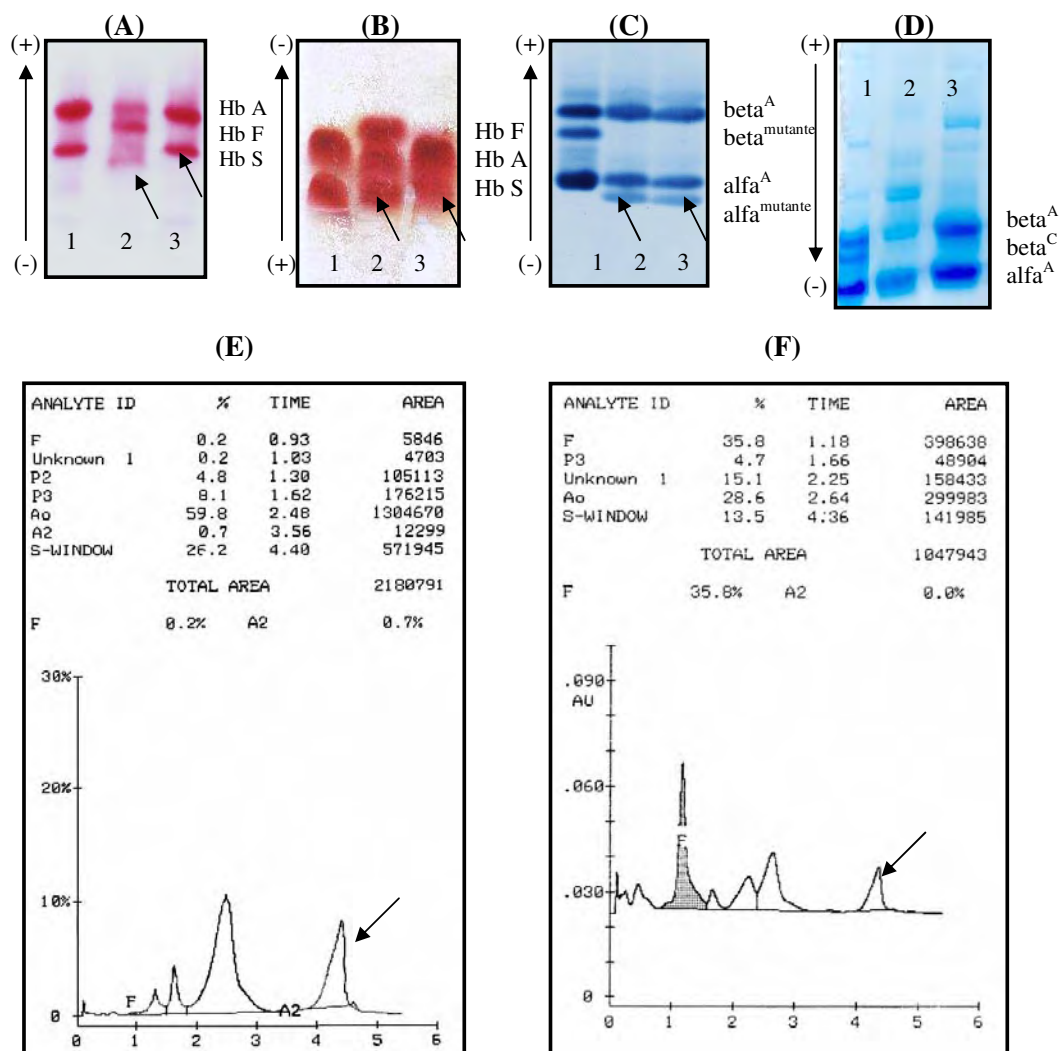


Figura 18: Perfil eletroforético e cromatográfico da Hb tipo G em heterozigose - **(A)** Eletroforese pH alcalino; 1. padrão Hb AS, 2. Hb FG, 3. Hb AG; **(B)** Eletroforese pH ácido, amostras 1. padrão Hb AS, 2. Hb AGF, 3. Hb AG; **(C)** Eletroforese de cadeias, pH alcalino; 1. padrão Hb AS, 2. Hb AGF, 3. Hb AG; **(D)** Eletroforese de cadeias, pH ácido; 1. padrão Hb AC, 2. Hb FG, 3. Hb AG; **(E)** e **(F)** Cromatogramas obtidos no Sistema VARIANT (Bio-Rad) para as amostras com perfil heterozigoto para Hb tipo G. **(F)** Amostra com Hb F aumentada. As setas indicam a fração variante.

As três amostras sugestivas de Hb Queens apresentaram migração eletroforética na posição de Hb S em pH alcalino e próxima à Hb S em pH ácido (Figura 19 A e B). Na eletroforese de cadeias polipeptídicas em pH alcalino, a cadeia mutante apresentou padrão de migração logo abaixo da cadeia alfa normal e em pH ácido, não ocorreu separação da cadeia variante (Figura 19 C e D).

Uma das amostras com Hb A igual a 79,0% e Hb F igual a 0,3 % apresentou o valor de Hb A2 igual a 4,5% que estava acima da normalidade, sugerindo a associação com beta talassemia. A Hb variante com 15,2% eluiu na janela de Hb S com tempo de retenção igual a 4,57 min. A segunda amostra com Hb A igual a 81,9% e Hb A2 igual a 3,4 % apresentou o valor de Hb F igual a 1,7% que estava acima da normalidade. A Hb variante com 13,0% eluiu na janela de Hb S com tempo de retenção igual a 4,66 min. A terceira amostra apresentou Hb A igual a 80,6%, Hb A2 igual a 3,1% e Hb F igual a 0,3%. A Hb variante com 15,7% também eluiu na janela de Hb S com tempo de retenção de 4,64. O valor médio do tempo de retenção para a Hb Queens foi de 4,62 min ($\pm 0,05$ min, variando de 4,57 a 4,66), com pico em forma de agulha, como visualizado na Figura 19 E.

A provável Hb Montgomery associada à alfa talassemia apresentou padrão de migração entre a posição da Hb F e Hb S em pH alcalino e em pH ácido, próximo a Hb S (Figura 20 A e B). Na eletroforese de cadeias polipeptídicas em pH alcalino, foi possível distinguir a fração mutante de cadeia alfa abaixo da cadeia alfa normal, a qual não apresentou separação em pH ácido (Figura 20 C e D). Na HPLC, os valores de Hb obtidos foram iguais a 84,6% de Hb A, 1,9% de Hb A2, 0,6% de Hb F e 13,0% de fração mutante com eluição na janela de Hb S com tempo de retenção igual a 4,48 min, com pico em forma de agulha como visualizado na Figura 20 E.

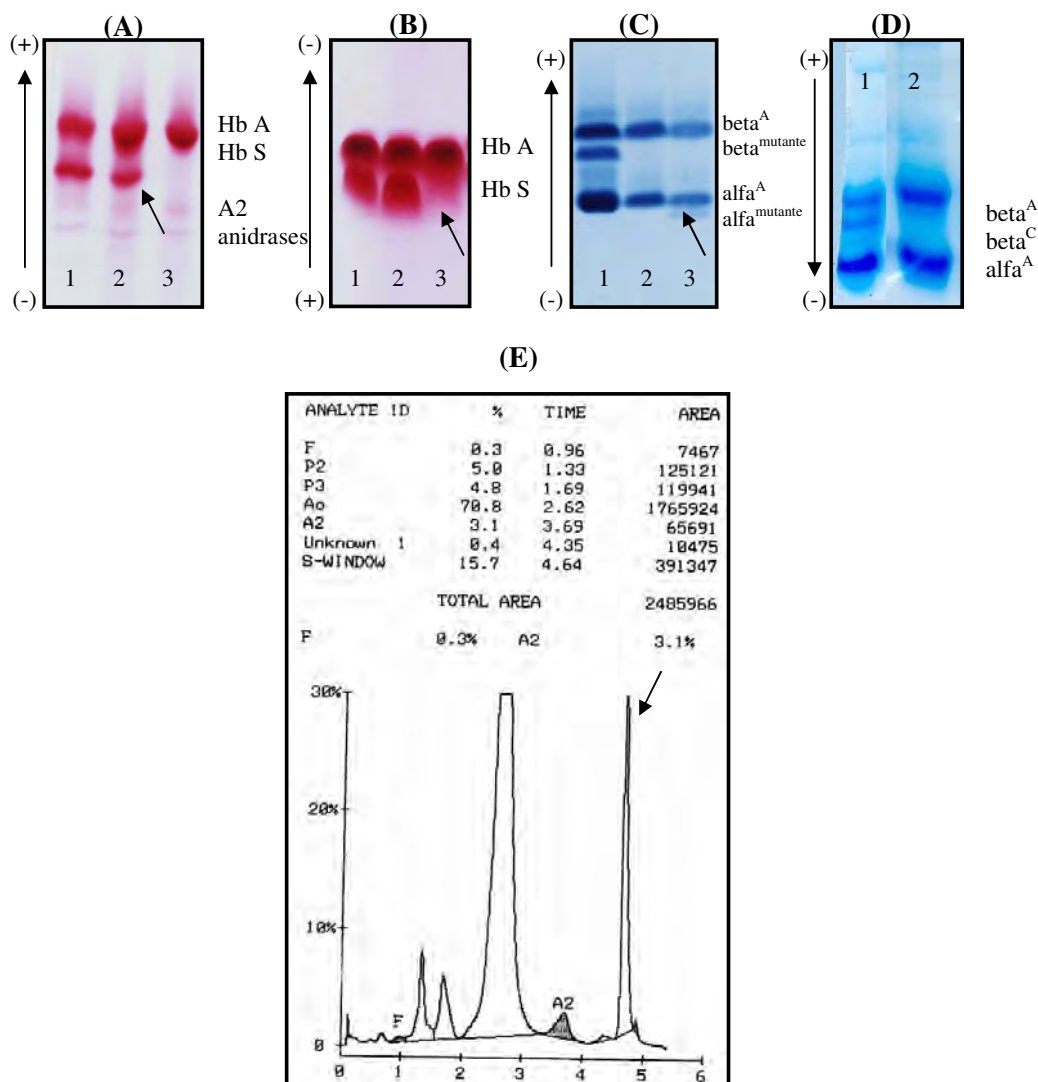


Figura 19: Perfil eletroforético e cromatográfico da Hb Queens em heterozigose - (A) Eletroforese pH alcalino; 1. padrão Hb AS, 2. Hb AQueens, 3. Hb AA; (B) Eletroforese pH ácido, amostras 1. e 2. padrão Hb AS, 3. Hb AQueens; (C) Eletroforese de cadeias, pH alcalino; 1. padrão Hb AS, 2. Hb AA, 3. Hb AQueens; (D) Eletroforese de cadeias, pH ácido; 1. padrão Hb AC, 2. Hb Queens; (E) Cromatograma obtido no Sistema VARIANT (Bio-Rad) para a amostra com perfil heterozigoto para Hb Queens. As setas indicam a fração variante.

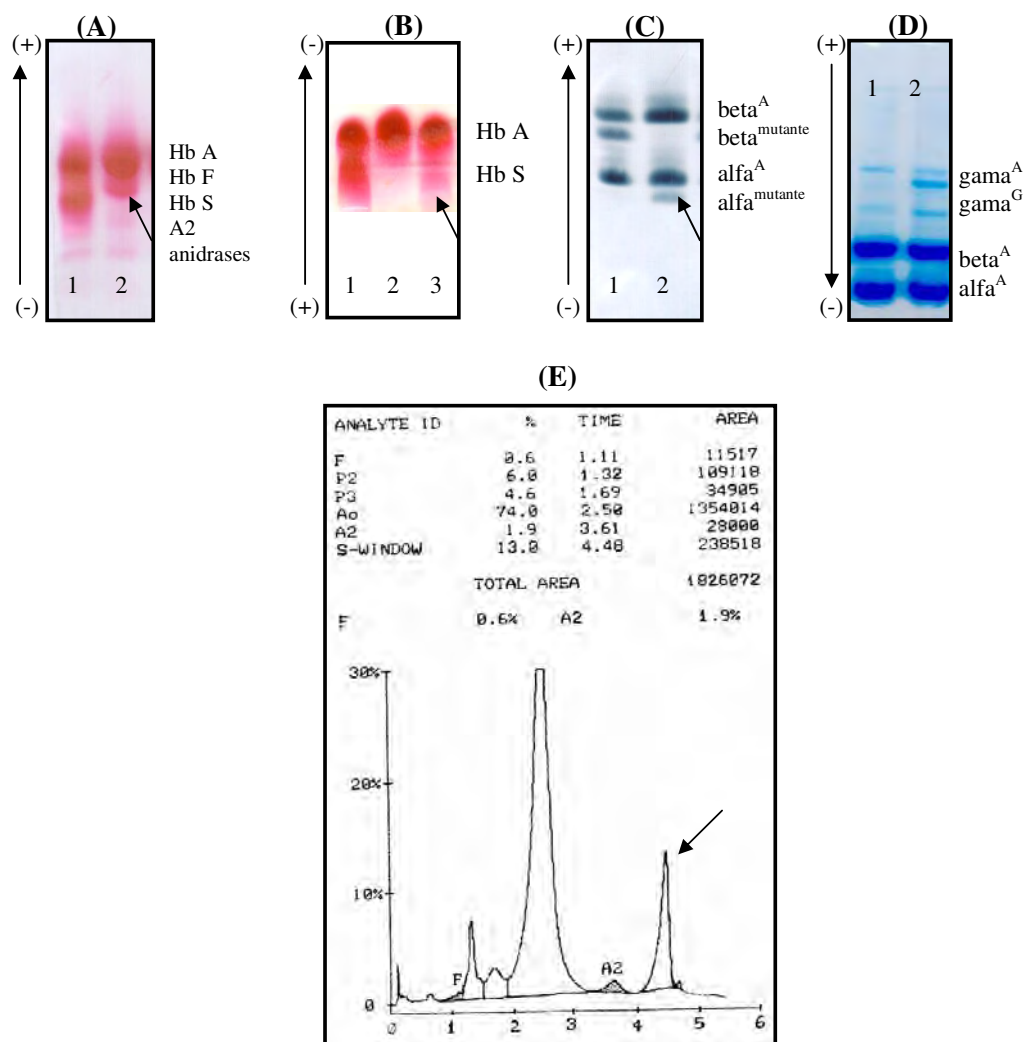


Figura 20: Perfil eletroforético e cromatográfico da Hb Montgomery em heterozigose - (A) Eletroforese pH alcalino; 1. padrão Hb AS, 2. Hb AMontgomery; (B) Eletroforese pH ácido, amostras 1. padrão Hb AS, 2. Hb AA, 3. Hb AMontgomery; (C) Eletroforese de cadeias, pH alcalino; 1. padrão Hb AS, 2. Hb AMontgomery; (D) Eletroforese de cadeias, pH ácido; 1. Hb AMontgomery, 2. Hb AA e Hb F; (E) Cromatograma obtido no Sistema VARIANT (Bio-Rad) para a amostra com perfil heterozigoto para Hb Montgomery. As setas indicam a fração variante.

Foi sugerido o fenótipo de Hb Q-índia para uma das amostras com migração eletroforética na posição da Hb S em pH alcalino e, em pH ácido com fração difusa na posição da Hb C (Figura 21 A e B). O perfil de migração em pH ácido não foi compatível com os mapas da literatura que apresentam a Hb Q-Índia com migração na posição da Hb A. Na eletroforese de cadeias em pH alcalino, foi possível visualizar uma fração difusa abaixo da cadeia alfa normal, a qual não pôde ser distinguida com precisão como fração mutante, como visualizado na Figura 21 C. Na análise cromatográfica foi possível observar a fração mutante de 15,0% que eluiu em janela desconhecida com tempo de retenção de 4,72 min. Esse cromatograma, apresentado na Figura 21 D, foi muito semelhante ao apresentado pelo fabricante sendo o tempo de retenção idêntico ao da Hb Q-Índia, sugerindo a presença desta Hb variante.

Em 35,0% das amostras com Hb variante, mutantes de cadeia alfa, não foi possível identificar uma suspeita fenotípica. Essas amostras que apresentaram perfis eletroforéticos e cromatográficos diversos, com resultados não compatíveis com uma suspeita fenotípica, terão a Hb variante identificada por sequenciamento do DNA.

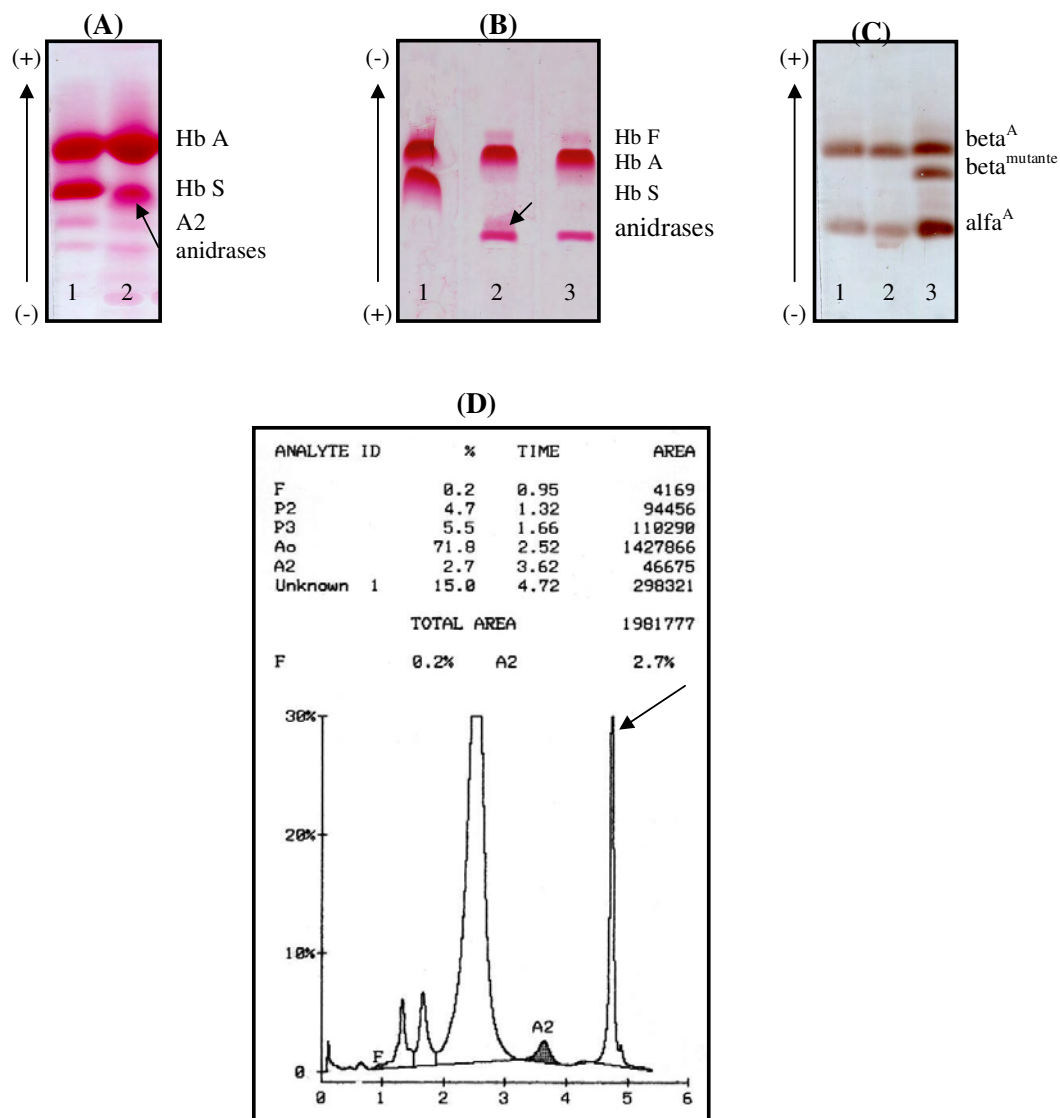


Figura 21: Perfil eletroforético e cromatográfico da Hb Q-Índia em heterozigose - (A) Eletroforese pH alcalino; 1. padrão Hb AS, 2. Hb AQ-Índia; (B) Eletroforese pH ácido, amostras 1. padrão Hb AS, 2. Hb AQ-Índia, 3. Hb AA; (C) Eletroforese de cadeias, pH alcalino; 1. Hb AA, 2. Hb AQ-Índia, 3. padrão Hb AS; (D) Cromatograma obtido no Sistema VARIANT (Bio-Rad) para a amostra com perfil heterozigoto para Hb Q-Índia. As setas indicam a fração variante.

4.3.3 Mutantes com fusão das cadeias delta e beta

Todas as Hb variantes resultantes de fusões das cadeias delta/beta encontradas foram sugestivas de Hb Lepore a qual apresentou padrão de migração na posição da Hb S em pH alcalino e padrão normal em pH ácido, como visualizado na Figura 22 A e B. Na eletroforese de cadeias polipeptídicas em pH alcalino, a cadeia mutante apresentou padrão de migração semelhante ao da Hb S e em pH ácido não ocorreu separação da cadeia variante (Figura 22 C e D).

Os valores percentuais médios de Hb dos portadores de Hb Lepore, obtidos pela HPLC estão apresentados na Tabela 12. Não foi possível obter os valores de Hb A2 devido à co-eluição da Hb variante. Apenas uma amostra apresentou o valor de Hb F dentro da normalidade. As demais amostras com Hb F aumentada foram separadas em dois grupos, com Hb Lepore sem associação com alfa talassemia e com Hb Lepore associada à alfa talassemia para comparação dos valores médios das frações de Hb. Verificou-se que os grupos não diferiram estatisticamente em nenhum valor de Hb.

O cromatograma da Hb Lepore está apresentado na Figura 22 E. O tempo médio de retenção da Hb Lepore foi igual a 3,49 min ($\pm 0,04$ min, variando de 3,42 a 3,56), com co-eluição na janela de Hb A2. Embora a Hb D-Iran também tenha apresentado eluição nessa mesma janela, o tempo de retenção médio da Hb Lepore foi menor, com diferença estatisticamente significativa ($p < 0,0001$).

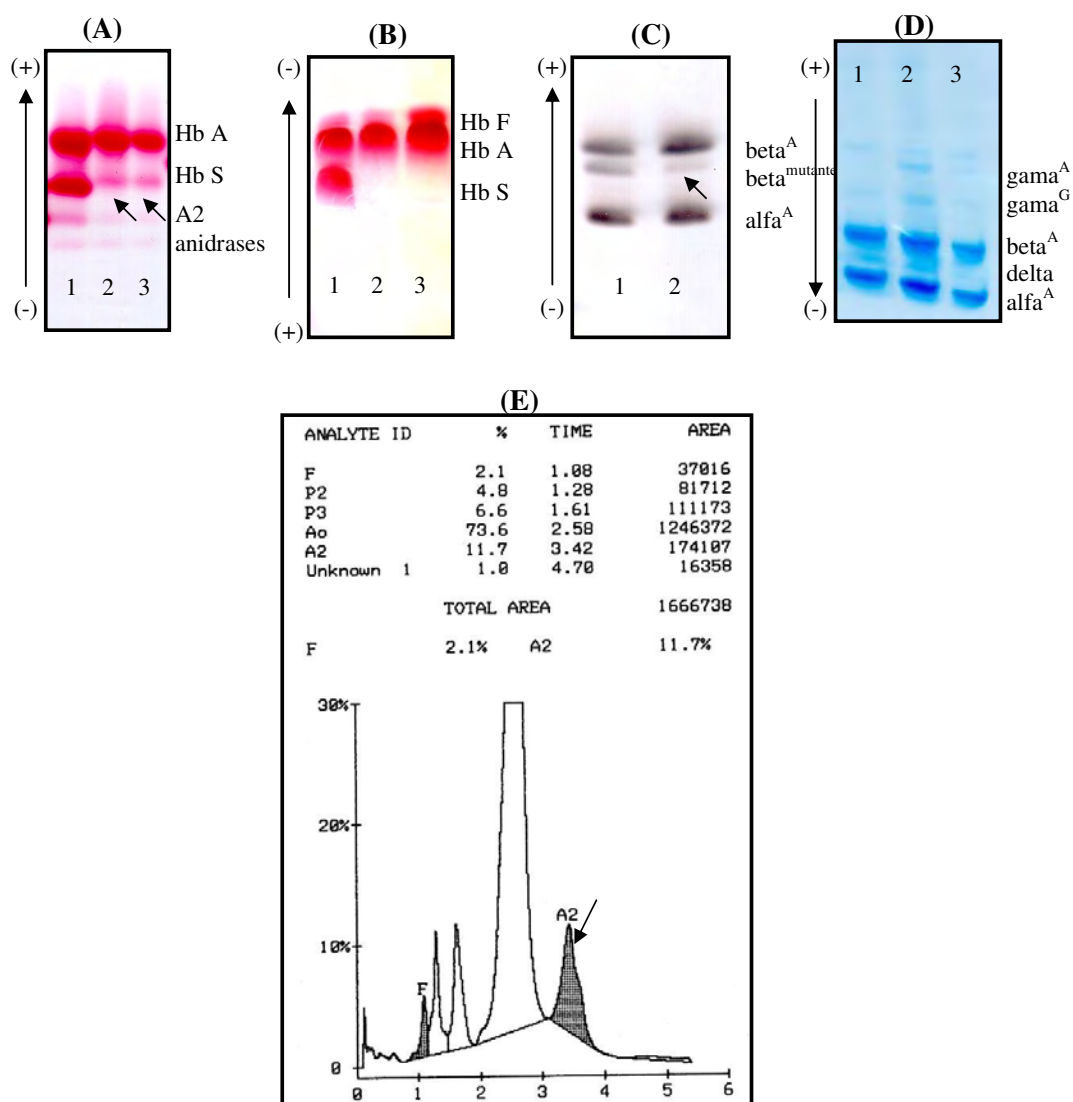


Figura 22: Perfil eletroforético e cromatográfico da Hb Lepore em heterozigose - (A) Eletroforese pH alcalino; 1. padrão Hb AS, 2. e 3. Hb ALepore; (B) Eletroforese pH ácido, amostras 1. padrão Hb AS, 2. e 3. Hb ALepore; (C) Eletroforese de cadeias, pH alcalino; 1. padrão Hb AS, 2. Hb ALepore. (D) Eletroforese de cadeias, pH ácido; 1. Hb AA, 2. e 3. Hb ALepore; (E) Cromatograma obtido no Sistema VARIANT (Bio-Rad) para a amostra com perfil heterozigoto para Hb Lepore. As setas indicam a fração variante.

Tabela 12: Valores percentuais médios das frações de Hb, obtidos por HPLC, nos grupos com Lepore em heterozigose.

Fenótipos	Média $\pm$ Desvio padrão (%)		
	Mínimo-Máximo (%)		
	ALepore	ALepore com Hb F aumentada	ALepore associada à alfa talassemia e Hb F aumentada
	N=1	N=10	N=4
Hb A	88,5	82,98 $\pm$ 2,21	82,30 $\pm$ 2,41
	–	79,4-85,5	79,6-85,0
Hb A2	–	–	–
	–	–	–
Hb F	1,2	4,90 $\pm$ 2,37	4,47 $\pm$ 2,45
	–	2,5-9,9	2,1-7,1
Hb Lepore	10,8	12,10 $\pm$ 1,13	13,12 $\pm$ 1,67
	–	10,0-13,6	11,7-14,9

N= número de amostras

4.4 Resumo do perfil eletroforético e cromatográfico das “Hb S-like”

Para facilitar a análise geral das Hb “S-like” descritas neste trabalho, foi feito um resumo do perfil eletroforético e cromatográfico que está apresentado na Tabela 13, assim como um resumo dos valores médios dos tempos de retenção, incluindo o máximo e mínimo, de cada Hb variante, agrupados na Tabela 14.

Tabela 13: Resumo dos perfis das Hb variantes “S-like” obtidos nas eletroforeses de Hb em pH alcalino e pH ácido e na HPLC.

Hb variante	Eletroforese de Hb em pH alcalino	Eletroforese de Hb em pH ácido	HPLC Janela de eluição
Lepore	S	A	A2
D-Iran	S	A	A2
Korle-Bu	S	A	D
D Los-Angeles	S	A	D
tipo G	S	S	S
Montgomery	Próxima de S	Próxima de S	S
Queens	S	S	S
Q-India	S	Próxima de C	desconhecida
Hasharon	S	S	desconhecida

Tabela 14: Valores dos tempos de retenção em minutos, obtidos por HPLC, das frações de Hb variantes.

Hb variante	N	Média $\pm$ Desvio padrão	Mínimo	Máximo
Lepore	15	3,49 $\pm$ 0,04	3,42	3,56
D-Iran	9	3,80 $\pm$ 0,06	3,70	3,86
Korle-Bu	16	4,05 $\pm$ 0,08	3,92	4,20
D Los-Angeles	24	4,24 $\pm$ 0,05	4,14	4,32
tipo G	3	4,35 $\pm$ 0,06	4,28	4,40
Montgomery	1	4,48	—	—
Queens	3	4,62 $\pm$ 0,05	4,57	4,66
Q-India	1	4,72	—	—
Hasharon	28	4,82 $\pm$ 0,02	4,79	4,85

N= número de amostras

4.5 Estabelecimento de mapas de migração

Após as análises anteriormente descritas e com a identificação das possíveis suspeitas fenotípicas, foi possível estabelecer o perfil de migração eletroforética das Hb avaliadas e das cadeias variantes. A Figura 23 ilustra o mapa de migração eletroforética em pH alcalino e pH ácido das suspeitas fenotípicas, e a Figura 24 mostra o mapa das cadeias polipeptídicas variantes em comparação com as cadeias normais, em pH alcalino e pH ácido.

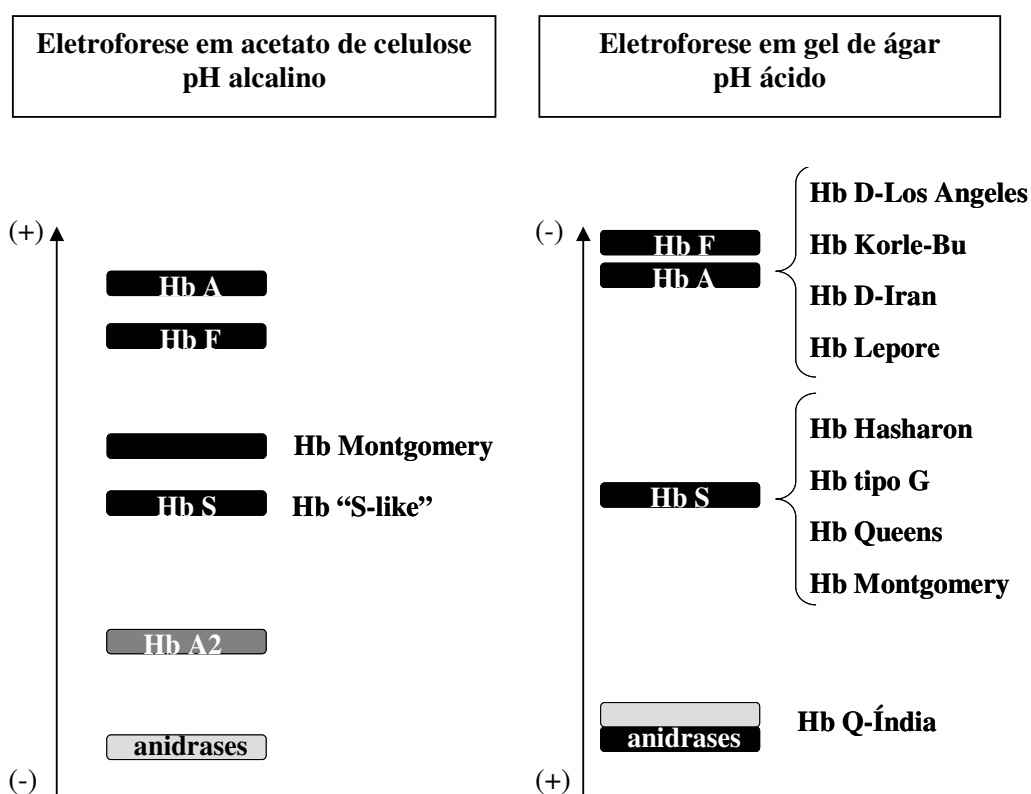


Figura 23: Disposição das mobilidades eletroforéticas das Hb "S-like" em acetato de celulose em pH alcalino e em gel de ágar em pH ácido.

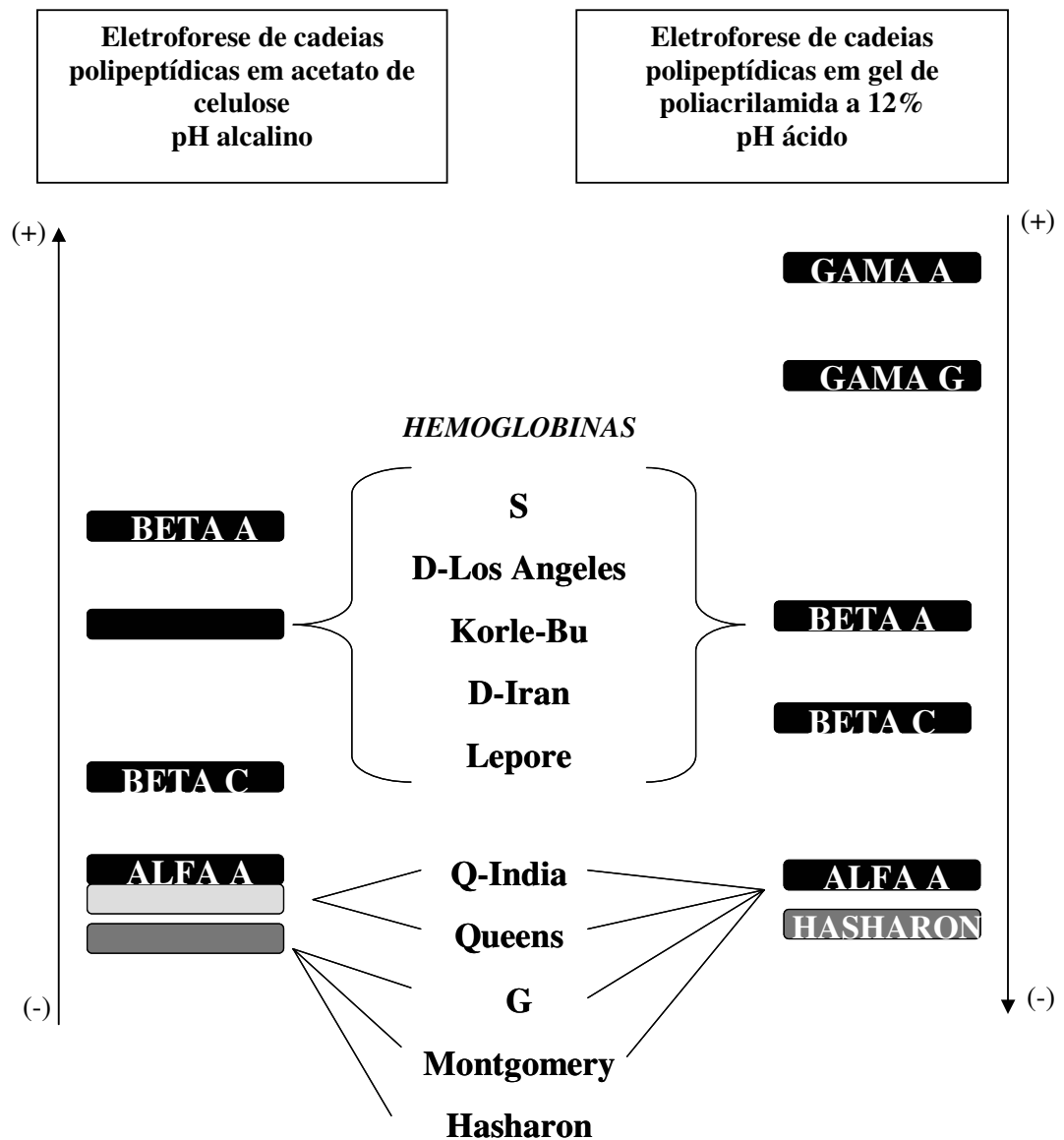


Figura 24: Disposição das mobilidades eletroforéticas das cadeias polipeptídicas das Hb variantes "S-like" em acetato de celulose em pH alcalino e em gel de poliacrilamida a 12% em pH ácido.

4.6 Material ilustrativo e educativo

Os resultados obtidos pelas análises eletroforéticas e cromatográficas de cada suspeita fenotípica foram agrupados para facilitar a consulta. Todas as suspeitas fenotípicas encontradas neste trabalho serão confirmadas por procedimentos de análise molecular e sequenciamento. Após estes procedimentos, as informações obtidas formarão o material que será disponibilizado na Internet e em CD interativo, orientando os profissionais no direcionamento de diagnóstico dessas variantes.

5 Discussão

5 Discussão

Para a identificação das Hb normais e variantes utilizadas no estabelecimento dos valores referenciais de Hb, para adultos normais e portadores de Hb S, foram utilizados os métodos eletroforéticos de rotina e a HPLC que permitiu a confirmação das Hb observadas pelos métodos anteriores, e a quantificação das frações de forma precisa. Assim como observado por Fisher et al. (1997), houve concordância entre os achados eletroforéticos e cromatográficos nas amostras avaliadas.

Joutovsky; Haddzi; Nardi (2004) demonstraram que a HPLC é uma importante ferramenta de análise para identificação das Hb variantes, principalmente, se utilizada a informação do seu tempo de retenção. Neste trabalho, foi possível verificar que os valores percentuais médios das Hb obtidos pela HPLC também são de grande utilidade, em especial para identificação da Hb S e a associação entre diferentes hemoglobinopatias, comparando-os com valores de normalidade e permitindo inferir fenótipos.

As análises exploratórias realizadas no grupo amostral com todos os valores de Hb mostraram sobreposição espacial dos grupos AS e ASH, pois apresentaram diferenças apenas na quantidade de Hb S. Também foi verificado que o grupo considerado heterozigoto, AS e ASH, apresentou uma distribuição intermediária entre o grupo AA e o SS, uma vez que apresentam tanto a Hb normal quanto a Hb variante. Na análise utilizando o *FasMap*, pôde-se observar que o duplo heterozigoto também apresentou distribuição intermediária, porém entre os grupos AS/ASH e o grupo SS, uma vez que apresenta a Hb S em heterozigose, associada à Hb C, destacando as interfaces da herança entre os genótipos e expressão fenotípica.

Pelas análises dos valores de Hb, de forma separada, utilizando o *FastMap*, foi possível obter uma visão espacial dos valores de Hb em 3D, corroborando os achados para homozigotos normais e anormais, heterozigotos e duplo heterozigotos. No entanto, as análises estatísticas foram fundamentais para testar essas diferenças, mostrando que apenas pela análise exploratória não foi possível inferir com precisão, as diferenças existentes entre os grupos analisados.

Os valores de referência de Hb A, Hb A2 e Hb F observados para o grupo AA podem ser usados como parâmetro em casos de suspeita da presença de uma Hb anormal, quando as porcentagens obtidas não forem compatíveis, corroborando com os achados de Roa; Turner; Aguinaga (1995) para a população afro-americana.

No grupo ASH a quantidade de Hb S foi menor que no grupo AS, com diferença estatisticamente significativa. Essa diminuição deve-se à associação com a alfa talassemia a qual decorre da deficiência na síntese de cadeia alfa, que acarretará decréscimo na formação de tetrâmeros de Hb S (SERJEANT, 1997; SHOKRANI; TURNER; AGUINAGA, 2000). Essa diferença foi confirmada, no grupo avaliado, pelo cálculo das razões entre Hb A e Hb S, no qual foi possível verificar uma razão maior no grupo ASH quando comparado à razão do grupo AS. Valores semelhantes foram observados por Roa; Turner; Aguinaga (1995), em uma população afro-americana adulta e com Hb S. A alteração destas razões pode ser um indicativo de associação com uma outra hemoglobinopatia (ROA; TURNER; AGUINAGA, 1995). Desta forma, foi possível diferenciar os grupos AS e ASH pela comparação dos valores percentuais médios de Hb S e das razões entre Hb A e Hb S.

Foi verificado também, que os grupos com Hb S mostraram valores de Hb A2 acima da normalidade, os quais devem ser considerados com precaução. Shokrani; Turner; Aguinaga (2000) propuseram que nessas situações, a associação entre a cadeia alfa e a cadeia beta variante é prejudicada, o que promove a associação da cadeia alfa à cadeia delta, aumentando os níveis de Hb A2, além da coeluição da Hb S glicosilada e outras subfrações na janela da Hb A2. Em estudos mais recentes utilizando técnicas de espectrometria de massa, Zurbriggen et al. (2005) propuseram que o aumento dos valores de Hb A2 em portadores de Hb S, deve-se à coeluição de um componente menor de Hb formado por uma cadeia alfa modificada pós-traducionalmente por carboamilação, associada à cadeia beta S.

Portanto, Shokrani; Turner; Aguinaga (2000) avaliando os valores de Hb A2 em amostras contendo Hb S, propuseram que valores até 5,2% em heterozigotos e até 5,9 % em indivíduos com Hb SS e Hb SC podem ser

considerados normais desde que não haja outro sinal de beta talassemia, Esses valores foram utilizados aqui para definir os valores de corte dos grupos amostrais. Para a população brasileira pode-se considerar como normal os valores de Hb A2 de 2,9 a 5,2% para Hb AS; 2,8 a 5,2% para Hb ASH; 0,8 a 5,6% para Hb SS e 3,8 a 5,7% para Hb SC, sendo esta a referência de diagnóstico por HPLC no Sistema VARIANT.

Os valores de Hb F nos portadores de Hb S em heterozigose, embora estivessem dentro da faixa de normalidade foram estatisticamente maiores que os do grupo controle, devido à presença da Hb variante e de seus possíveis haplótipos. No grupo SS, todas as amostras apresentaram valores acima da normalidade que podem ser resultantes do uso de medicamentos, Persistência Hereditária de Hb F ou característica do haplótipo. No grupo SC não foram considerados os valores de Hb F para a avaliação global, devido à pouca quantidade de amostras o que prejudicaria esta análise.

As amostras com Hb “S-like” utilizadas no presente estudo foram provenientes de diferentes localidades do Brasil. No entanto, verificou-se que os estados de SP e RS foram responsáveis pelo envio da maioria delas, pois agregam serviços de referência que enviam as amostras com suspeitas de Hb variantes provenientes do Programa de Triagem Neonatal para a identificação dos mutantes encontrados nos recém-nascidos e em seus pais.

Os testes de triagem realizados para caracterização das Hb “S-like” incluíram, além dos procedimentos eletroforéticos e cromatográficos, os testes de resistência globular osmótica em solução de NaCl a 0,36% e análise a fresco da morfologia eritrocitária, os quais fornecem informações sobre uma possível hemoglobinopatia ou anemia carencial. Nas amostras analisadas, foram encontrados poucos resultados positivos na resistência globular osmótica em solução de NaCl, uma vez que este teste é indicado principalmente, para triagem de talassemia do tipo beta e suas combinações com outros mutantes. A maior parte das amostras apresentou morfologia eritrocitária com alterações leves ou discretas, confirmando os sintomas brandos das Hb variantes em heterozigose.

Os métodos eletroforéticos são tradicionalmente escolhidos para a identificação e quantificação das Hb normais e variantes uma vez que as análises podem ser efetuadas com rapidez e baixo custo (CLARKE; HIGGINS, 2000). No entanto, a precisão é baixa comparada aos métodos cromatográficos. Em pH alcalino, pode ocorrer co-migração de várias Hb variantes como Hb C, Hb E e Hb O; Hb S Hb D e Hb G (CLARKE; HIGGINS, 2000; ZAMARO et al., 2002). Neste trabalho, evidenciou-se a dificuldade da identificação dos mutantes que apresentaram padrão de migração semelhante ao da Hb S neste pH.

Na eletroforese em pH ácido é possível a separação de algumas Hb como Hb C da Hb E e Hb O; Hb S da Hb D e Hb G, porém não permite a distinção entre as Hb E e Hb O; Hb D e Hb G que migram na mesma posição (CLARKE; HIGGINS, 2000). Nas Hb “S-like” não foi possível a distinção dos mutantes, pois vários deles apresentaram padrão de migração semelhante, como as Hb D-Los Angeles, Hb Korle-Bu, Hb D Iran e Hb Lepore que migraram na posição da Hb A. Pelos resultados encontrados neste pH foi possível excluir a presença de Hb S e, o possível fenótipo, só pôde ser inferido com a realização de outros testes laboratoriais. Portanto, as eletroforeses em pH alcalino e pH ácido são indicadas como testes de rastreamento inicial para a detecção de Hb variantes e metodologias complementares devem ser realizadas para a caracterização das Hb com migração semelhante (ONDEI; ZAMARO; BONINI-DOMINGOS, 2005).

Pelos resultados obtidos na triagem, observou-se um número elevado de associação entre Hb variantes e talassemia alfa. Por muitos anos a frequência de talassemia alfa foi subestimada devido a métodos pouco resolutivos de diagnóstico laboratorial (BONINI-DOMINGOS, 2004). Em estudos realizados por Wenning et al (2000) e Bonini-Domingos (2004) foi relatada a alta frequência de associação entre talassemia alfa e variantes de Hb na região sudeste do Brasil, confirmando a intensa miscigenação da população brasileira.

Para a identificação da cadeia polipeptídica mutante das Hb variantes foi realizada a eletroforese de cadeias polipeptídicas, que é uma metodologia de separação das globinas bastante precisa, podendo ser utilizada para a identificação das cadeias mutantes como uma análise pré-molecular (SCHNEIDER, 1974). Em

pH ácido, foi possível a visualização das cadeias alfa e beta normais e das cadeias gama glicina e gama alanina nas amostras que apresentaram Hb F aumentada, porém, não foi uma metodologia eficiente para a separação das cadeias variantes das Hb “S-like”, uma vez que só visualizou-se a cadeia alfa mutante da Hb Hasharon. A técnica analítica em pH alcalino apresentou boa resolução para os mutantes de cadeias alfa, beta e fusão delta/beta, permitindo a separação da cadeia globínica alterada em todas as Hb variantes. Com os resultados obtidos nas análises de globina, foi possível separar os mutantes segundo a cadeia alterada.

A focalização isoeletrica é uma técnica eletroforética alternativa para a identificação de Hb variantes. Consiste na migração das proteínas para sua posição, de acordo com seu ponto isoeletrico (PI), concentrando-se zonalmente à medida que a substância alcança a posição de pH estabelecido (ATLAND; KAEMPFER; GRANDA, 1979). Apresenta melhor resolução que os demais métodos eletroforéticos, porém, com custo elevado (WADA, 2002). Nas amostras analisadas, não foram obtidos bons resultados, pois os hemolisados não apresentaram boa qualidade e os padrões de migração das frações variantes foram muito próximos com os anfólitos disponíveis. Desta forma, a escolha da técnica eletroforética a ser utilizada depende das condições disponíveis em cada laboratório de rotina para um resultado adequado e correta interpretação dos perfis obtidos.

A HPLC, estabelecida pelo Sistema automatizado VARIANT (Bio-Rad), é um método que permite o diagnóstico de Hb anormais com rapidez e precisão, utilizando uma pequena quantidade de amostra. (OLD, 2003; OU; ROGNERUD, 2001). A HPLC de troca iônica permite a quantificação das Hb A2, Hb F, Hb A, Hb S e Hb C e o rastreamento de Hb variantes, sendo uma importante metodologia para a investigação de hemoglobinopatias em laboratórios de rotina (FISHER et al., 1997; CLARKE; HIGGINS, 2000; JOUTOVSKY; HADDZI; NARDI, 2004). As análises da porcentagem da Hb variante e do tempo de retenção permitem, em muitos casos, uma identificação mais precisa do mutante do que pelos métodos eletroforéticos (JOUTOVSKY; HADDZI; NARDI, 2004, 2004).

Para as Hb “S-like”, as análises cromatográficas foram fundamentais no levantamento das prováveis Hb variantes, sendo também possível a quantificação precisa das frações de Hb A, Hb variante e Hb F. Os valores de Hb F foram utilizados para a separação dos grupos segundo os valores de normalidade, pois pela falta de informações sobre a idade dos indivíduos, não foi possível separá-los previamente. A quantificação da Hb A2 não foi possível em alguns casos em que a Hb variante eluiu na mesma janela da Hb A2 ou quando o cromatograma apresentou desvio na linha de base.

Assim como observado por Clarke; Higgins (2000) e Ondeí; Zamaro; Bonini-Domingos (2005), o uso em combinação, dos métodos eletroforéticos e cromatográficos foi extremamente importante para identificar e quantificar as diferentes frações de Hb possibilitando a indicação da suspeita fenotípica na maioria das amostras.

Entre as Hb “S-like” encontradas a que apresentou maior número de amostras foi a Hb Hasharon, sendo o estado de RS responsável pelo envio de 61% delas, confirmando uma forte influência italiana na colonização daquela região (LISOT; SILLA, 2004). A segunda Hb variante com maior número de amostras foi a Hb D-Los Angeles, que foram provenientes de diferentes localidades. Como já relatado por Naoum et al. (1986), a população brasileira apresenta diversidade étnica com distribuição heterogênea das Hb anormais.

As amostras de Hb D-Los Angeles, Hb Korle-Bu e Hb D-Iran avaliadas neste trabalho apresentaram resultados eletroforéticos compatíveis com a literatura e auxiliaram na identificação do possível fenótipo. No entanto, a distinção entre elas só foi possível com a análise pela HPLC, a qual deve ser avaliada cuidadosamente, pois tanto a Hb D-Los Angeles quanto a Hb Korle-Bu apresentam eluição na janela de Hb D. Embora tenham uma faixa de sobreposição nos tempos de retenção, valores entre 3,92 min e 4,13 min e cromatograma com desvio na linha de base sugerem Hb Korle-Bu e valores entre 4,21 min e 4,32 min sugerem Hb D-Los Angeles. Algumas amostras com Hb D-Los Angeles apresentaram os cromatogramas com desvio na linha de base que podem ser explicados por problemas ou diferença nos lotes da coluna de eluição. Essas

amostras devem ter os tempos de retenção analisados cuidadosamente, pois podem ser confundidas com a Hb Korle-Bu. A Hb D-Iran foi facilmente distinguida das demais por apresentar eluição na janela de Hb A2.

Na talassemia alfa ocorre diminuição na síntese de cadeia alfa. Essa deficiência de cadeias gera uma diminuição na produção de tetrâmeros mutantes em indivíduos heterozigotos com associação da talassemia alfa (STAMATOYANNOPOULOS et al., 1994). Desta forma, entre as suspeitas fenotípicas, foram separadas as amostras com talassemia alfa associada para investigar possíveis diferenças nos valores das frações de Hb. Também foram separadas as amostras com Hb F aumentada que podem ser recém-nascidos com valores de Hb ainda não estabilizados.

Nas análises dos valores percentuais médios das frações de Hb não foram observadas diferenças entre os grupos com Hb D-Los Angeles em heterozigose e Hb D-Los Angeles em heterozigose associada à alfa talassemia, possivelmente pela pequena quantidade de amostras em cada grupo. Como as suspeitas de talassemias não foram confirmadas molecularmente, também é possível que ocorram falsos positivos, devido à dificuldade de identificação da Hb H.

O grupo com Hb D-Los Angeles com Hb F aumentada apresentou valores de Hb F maiores e Hb variante menores que os demais grupos, sendo o motivo destes resultados desconhecido. Já os valores de Hb A2 em todas as amostras analisadas apresentaram-se abaixo dos valores de normalidade preconizados pelo LHGDH, porém, foram concordantes com os encontrados por Dash (1998). Os valores diminuídos de Hb A2, obtidos pela HPLC de troca iônica, deve-se a um problema na linha de base entre os picos de Hb A2 e Hb D que se apresenta incompleta, não permitindo a quantificação acurada da fração de Hb A2, sendo necessárias outras metodologias para sua quantificação (COTTON, 1999).

Foi encontrado um caso de interação entre Hb D-Los Angeles e Hb S. A associação entre estas Hb variantes em que os portadores apresentam sintomas graves semelhantes aos da Hb S em homozigose já foram relatados na literatura (ZAGO; COSTA, 1988). Também foi encontrado um caso com interação entre a Hb D Los-Angeles e a Hb Korle-Bu que parece ser a primeira descrição desta

associação. A análise pela HPLC sugeria Hb D-Los Angeles em homozigose, pois a fração de 84,1% eluiu com um tempo de retenção igual a 4,27 min, característico de Hb D-Los Angeles. O diagnóstico da interação entre essas duas Hb variantes só foi possível com a análise molecular.

Os resultados das análises dos valores percentuais médios das frações de Hb das amostras com Hb Korle-Bu em heterozigose, com e sem associação de talassemia alfa, foram semelhantes aos já descritos para a Hb D-Los Angeles, os quais não apresentaram diferenças estatisticamente significativas. Apenas o grupo com valores de Hb F aumentados apresentaram valores de Hb F maiores e valores da fração variante menores que os demais grupos. Essas amostras com Hb F variando de 1,6% a 66,1% podem ser de recém-nascidos.

A Hb D-Iran é uma variante rara, sendo que os valores das frações de Hb em seus portadores não puderam ser analisados entre os grupos devido ao pequeno número de amostras, consistindo em um problema de amostragem. De Marco et al. (1994), analisando 36 indivíduos italianos, com valores de Hb A2 e Hb F normais, relatou uma fração de Hb D-Iran igual $39,3\% \pm 4,5\%$. Nas amostras analisadas, com Hb F dentro dos valores de normalidade, foi encontrado um valor percentual médio da variante maior, que pode ser uma característica do mutante na população brasileira.

Algumas Hb variantes, mutantes de cadeia beta, não puderam ser identificadas, pois os perfis eletroforéticos e cromatográficos não foram compatíveis com os perfis encontrados na literatura. Com as análises moleculares, será possível a correta identificação, podendo ser encontrados novos mutantes ainda não descritos no Brasil.

As amostras de Hb Hasharon, mutante de cadeia alfa, apresentaram resultados eletroforéticos compatíveis com a literatura, que auxiliaram na identificação do possível fenótipo. Em recém-nascidos, a fração com migração próxima à Hb S corresponde ao tetrâmero formado por cadeias alfa mutante e cadeia gama (ZAGO; COSTA; BOTTURA, 1982). A Hb Hasharon foi a única Hb “S-like” que apresentou separação da cadeia alfa variante na eletroforese de cadeias polipeptídicas em pH ácido, o que auxiliou na sua identificação.

Da mesma forma que nos mutantes de cadeia beta, não houve diferença nos valores das frações de Hb entre os grupos com e sem associação de talassemia alfa. Como a mutação ocorre no gene alfa2, são esperados valores da fração variante maiores que naquelas mutações no gene alfa1. Nas amostras analisadas, os valores percentuais da Hb Hasharon com Hb F dentro dos valores de normalidade foram maiores que os encontrados por Lehman; Vella (1974), em indivíduos de Israel, Itália, Inglaterra, Canadá, Romênia e Colômbia, e maiores que os descritos por Zago; Costa; Bottura (1982) em uma família brasileira de descendência italiana. A diferença pode ser devido ao sistema utilizado para quantificação da fração variante, comprovando que cada laboratório deve ter a padronização, tanto para resultados normais quanto para as Hb variantes.

A co-eluição de tetrâmeros formados pelas cadeias alfa variantes e cadeias gamas na janela da Hb A2 explicam esses valores aumentados nas amostras com Hb F aumentada, que possivelmente, são de recém-nascidos. Nessas amostras também foram verificados valores de Hb A e Hb variante menores que nos grupos com Hb F dentro dos valores de normalidade, as quais estabilizarão seis meses após o nascimento (HONIG; ADAMS III, 1986; NAOUM, 1997).

A Hb G que apresenta migração eletroforética semelhante à Hb S em pH alcalino foi primeiramente identificada no oeste da África por Edington; Lehman (1954). Nas amostras encontradas neste trabalho, em que foi sugerida a Hb tipo G, foi observado perfil eletroforético da cadeia globínica variante em pH alcalino semelhante ao da Hb G-Philadelphia, Hb variante resultante da substituição do aminoácido asparagina por lisina no códon 68 da globina alfa (HONIG; ADAMS III, 1986). No entanto, não houve concordância entre os achados eletroforéticos e cromatográficos, não sendo possível distinguir o subtipo específico.

Na literatura há poucos relatos sobre o perfil eletroforético da Hb Queens que é uma Hb rara encontrada, principalmente, em populações orientais. Desta forma, a análise pela HPLC apresentando perfil cromatográfico semelhante ao especificado pelo manual do fabricante, foi de grande importância para sugerir a suspeita fenotípica (LEE et al., 1992). A fração variante que eluiu na janela da Hb S apresentou concentração menor que a Hb S em heterozigose.

A única suspeita de Hb Montgomery encontrada apresentou resultados eletroforéticos e cromatográficos compatíveis com a literatura, com valores percentuais de Hb e tempo de retenção sugestivos de Hb Montgomery em heterozigose (JOUTOVSKY; HADZI-NESIC; NARDI, 2004). Eluindo na janela da Hb S, a fração mutante apresentou valor percentual e tempo de retenção menores que os verificados nas amostras com Hb S em heterozigose.

Embora os resultados eletroforéticos para a suspeita de Hb Q-India tenham sido discordantes, foi sugerido esse fenótipo devido ao padrão apresentado na HPLC com tempo de retenção da fração variante idêntico ao estabelecido pelo manual do fabricante (LIBRARY OF ABNORMAL HEMOGLOBIN OF BIO-RAD, 1994), confirmando a importância da análise cromatográfica na identificação das prováveis Hb variantes

Algumas Hb variantes mutantes de cadeia alfa não puderam ser identificadas, pois os perfis eletroforéticos e cromatográficos não foram compatíveis com os perfis da literatura. Essas amostras apresentaram resultados mais diversos que os mutantes de cadeia beta sem suspeita fenotípica e as análises moleculares permitirão a correta identificação da Hb variante.

Todas as amostras sugestivas de Hb Lepore apresentaram perfil eletroforético e cromatográfico compatíveis com essa suspeita. Segundo Ropero et al. (1999), a Hb variante constitui de 6% a 15% da Hb total e os níveis de Hb A2 podem estar normais ou discretamente diminuídos. Os valores de Hb F apresentam-se aumentados na maioria dos casos, devido a uma associação com um polimorfismo C para T na posição 158 no gene gama^G. Neste trabalho, foram observados valores de Hb F acima da normalidade com exceção de uma amostra. Não foi possível quantificar a Hb A2 devido à co-eluição da fração variante. Os valores percentuais da Hb Lepore apresentaram-se dentro dos valores estabelecidos por Ropero et al. (1999). A associação com alfa talassemia não altera a formação da Hb variante, nem o fenótipo (VIPRAKASIT et al., 2002). Embora a Hb D-Iran, mutante de cadeia beta, tenha eluído na mesma janela, é possível diferenciá-las pelo valor percentual da fração mutante, tempo de retenção e característica do cromatograma.

Podem ocorrer variações nos tempos de retenção das frações de Hb devido à diferença na coluna do aparelho, sistemas de eluição ou pela característica da população. Essa variação é verificada pela comparação dos valores estabelecidos neste trabalho com os de Joutovsky; Hadzi-Nesic; Nardi (2004) para a população americana, sugerindo que cada laboratório deve padronizar seus valores de referência para sua população em estudo.

Os perfis de migração eletroforética das Hb “S-like” e das cadeias globínicas permitem o direcionamento na identificação da suspeita fenotípica. A localização das frações apresentadas nos mapas são posições estimadas podendo ocorrer variações dependendo das condições de realização da técnica, voltagem utilizada, tempo de corrida e quantidade de amostra utilizada.

6 Conclusões

6 Conclusões

Os valores de Hb estabelecidos, por HPLC, em adultos normais e portadores de Hb S, poderão ser usados como referência em estudos populacionais, sendo que valores de Hb A menores que os do grupo normal, Hb A2 e Hb F aumentados, e a presença de fração variante eluída na janela de Hb S são características fenotípicas sugestivas da Hb S. Essas variações nos valores de Hb devem ser observadas isoladamente para sugerir as possíveis associações com outras hemoglobinopatias. Os níveis aumentados de Hb A2 também devem ser avaliados com precaução para evitar diagnósticos incorretos e para confirmar as suspeitas de Hb S, tendo em vista a ausência desses adutos em outras hemoglobinopatias.

As análises computacionais, utilizadas para comparar os diferentes fenótipos com Hb S, permitem a redução da dimensionalidade para visualização das diferenças entre os grupos. No entanto, por se tratar de análises exploratórias, devem ser analisadas com cautela e em conjunto com testes inferenciais.

Para a correta identificação das Hb variantes é necessário a associação de metodologias laboratoriais clássicas, pois as Hb “S-like” apresentam perfis semelhantes em várias metodologias de análise. Tais Hb variantes podem ser incorretamente identificadas com o uso de métodos pouco resolutivos.

Para a identificação da cadeia alterada, a eletroforese de cadeias polipeptídicas em pH alcalino é mais resolutiva que em pH ácido, permitindo separar todas as globinas mutantes das suspeitas fenotípicas descritas neste estudo. A focalização isoeletrica é uma técnica eficaz para o diagnóstico das Hb variantes. No entanto, seu uso é dificultado em amostras que não apresentam boa qualidade e nas Hb “S-like” que mostram padrões de migração muito próximos.

Na análise cromatográfica, tanto a Hb D-Los Angeles quanto a Hb Korle-Bu apresentam eluição na janela pré-estabelecida como Hb D no Sistema VARIANT. Porém, o tempo de retenção médio da Hb D-Los Angeles é maior que o da Hb Korle-Bu. Uma diferença adicional entre as duas variantes é o desvio na linha de base e valor de Hb A2 igual a zero no cromatograma da Hb Korle-Bu. Para a diferenciação dessas duas Hb variantes é necessária uma análise cuidadosa

do tempo de retenção da fração variante, pois podem ocorrer casos de Hb D-Los Angeles com cromatograma apresentando desvio na linha de base que podem ser confundidas com a Hb Korle-Bu.

O tempo de retenção médio estabelecido para a fração da Hb D Los-Angeles é de 4,24 min com valores mínimo e máximo de 4,14 min e 4,32 min, respectivamente. Para a Hb Korle Bu é de 4,05 min com valores mínimo e máximo de 3,92 min e 4,20 min. Como há uma faixa de sobreposição entre os valores dos tempos de retenção dessas Hb variantes é necessária a análise por biologia molecular para identificação precisa do mutante. Para a Hb D-Iran foi estabelecido um tempo de retenção médio igual a 3,80 min com valores mínimo e máximo iguais a 3,70 min e 3,86 min, respectivamente.

A Hb Hasharon, em pH alcalino, apresenta padrão de migração na posição da Hb S e em amostras de recém-nascidos, a migração é próxima à posição da Hb S. Em pH ácido a fração migra na posição da Hb S, podendo a banda estar difusa. Na análise cromatográfica, o tempo médio de retenção estabelecido para a fração variante é igual a 4,82 min com valor mínimo de 4,79 min e máximo de 4,85 min, com perfil de pico em agulha e eluição em janela desconhecida.

Na suspeita de Hb tipo G, que migra na posição da Hb S tanto em pH alcalino quanto em pH ácido, o tempo de retenção médio estabelecido para a fração variante é 4,35 min com valor mínimo de 4,28 min e máximo de 4,40 min, com eluição na janela de Hb S.

Para a Hb Queens, que apresentaram migração eletroforética na posição de Hb S em pH alcalino e próxima à Hb S em pH ácido, o tempo de retenção médio estabelecido para a fração variante é de 4,62 min com valor mínimo de 4,57 min e máximo de 4,66 min, com pico em forma de agulha na janela de Hb S.

Os perfis cromatográficos das amostras com suspeita de Hb Montgomery e com suspeita de Hb Q-India podem ser consultados para auxiliar a identificação dos mutantes em outros estudos. No entanto, para o estabelecimento de valores referenciais incluindo os de tempo de retenção, é necessária uma amostragem maior.

Para a Hb Lepore que apresenta perfil eletroforético semelhante ao dos mutantes de cadeia beta descritos anteriormente, o tempo de retenção médio estabelecido para a fração variante é de 3,49 min com valor mínimo de 3,42 min e máximo de 3,56 min, com eluição na janela de Hb A2. Embora a Hb D-Iran também apresente eluição nesta janela, seu tempo de retenção é maior que o da Hb Lepore.

A diversidade de Hb “S-like” encontrada revela a necessidade de diferentes recursos laboratoriais para que os mutantes possam ser corretamente identificados. O estabelecimento dos perfis de migração auxiliará no diagnóstico dessas Hb variantes. O material ilustrativo e educativo que será disponibilizado na Internet e em CD interativo será de grande utilidade aos profissionais para o direcionamento na identificação das Hb variantes.

7 Referências

7 Referências

ABRAHAM, R. et al. Hb Q-India: an uncommon variant diagnosed in three Punjab patients with diabetes is identified by a novel DNA analysis test. **Journal of Clinical Pathology**, v. 56, p. 296-299, 2003.

ALTER, B. P. et al. Globin chain electrophoresis: a new approach to the determination of the $G\gamma^A\gamma$ ratio in fetal haemoglobin and to studies of globin synthesis. **British Journal of Haematology**, v. 44, p. 527-532, 1980.

ATLAND, K.; KAEMPFER, M.; GRANDA, H. Improved Screening test for Abnormal hemoglobins from dried blood Samples. **Human Genetics**, v. 53, n.1, p. 97-100, dec.1979.

BAIGET, M.; DEL RIO, E.; GIMFERRE, E. Hemoglobin D-Punjab ($\beta 121$ GLU→GLN) in a Spanish Family. **Hemoglobin**, v. 6, n. 2, p. 193-198, 1982.

BAGLIONI C. The fusion of two peptide chains in hemoglobin Lepore and its interpretation as a genetic deletion. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America – Physical Sciences**, v. 48, p. 1880-1886, 1962.

BANK, A. Understanding globin regulation in β -thalassemia: it's as simple as α , β , γ , δ . **The Journal of Clinical Investigation**, v. 115, n. 6, p. 1470-1473, 2005.

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, p. 971-982, 1978.

BONINI-DOMINGOS, C. R. **Hemoglobinopatias no Brasil**: variabilidade genética e metodologia laboratorial. São José do Rio Preto, 1993. 232 f. Tese

(Doutorado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista.

BONINI-DOMINGOS, C. R. et al. Estudo de hemoglobinas anormais em doadores de sangue e recém-nascidos de São José do Rio Preto, SP. **NewsLab**, 41. ed, p. 92-98, 2000.

BONINI-DOMINGOS, C. R. Thalassemia screening in Brazil – Results for 20 years. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 26, n. 4, p. 288-289, 2004.

BONINI-DOMINGOS, C. R. Protocolos de metodologias laboratoriais clássicas para o diagnóstico de hemoglobinopatias. São José do Rio Preto: Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, 2003. Disponível em: <<http://www.LHGDH.ibilce.unesp.br>>. Acesso em 22 de julho de 2005.

BRIMHALL, B. et al. Hemoglobin Alabama [β 39(C5)Gln→Lys] and Hemoglobin Montgomery [α 48(CD 6)Leu→Arg]. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 379, p. 28-32, 1975.

CHANGTRAKUN, Y. et al. Compound heterozygosity for Hb Korle-Bu (β 73; Asp-Asn) and Hb E (β 26; Glu-Lys) with a 3.7-kb deletional α -thalassemia in Thai patients. **Annals of Hematology**, v. 81, n. 7, p. 389-393, 2002.

CHARACHE, S.; MONDZAC, A.M.; GESSNER, U. Hemoglobin Hasharon (α 47^{his}(CD5) β 2): a Hemoglobin Found in Low Concentration. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 48, p. 834-847, 1969.

CHINELATO-FERNANDES, A. R. **Diferenciação molecular de mutantes de hemoglobinas humanas na população brasileira**. São José do Rio Preto, 2003.

227 f. Tese (Doutorado em Genética) - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista.

CHUI, D. H. K.; FUCHAROEN, S.; CHAN, V. Hemoglobin H disease: not necessarily a benign disorder. **Blood**, v. 101, n. 3, p. 791-800, 2003.

CLARKE, G. M.; HIGGINS, T. N. Laboratory Investigation of Hemoglobinopathies and Thalassemias: Review and Update. **Clinical Chemistry**, v. 46, p. 1284-1290, 2000.

CLEGG, J. B. Can the product of the gene theta be a real globin? **Nature**, v. 329, n. 1, p. 465-466, 1987.

COTTON, F et al. Interference of Hemoglobin D in Hemoglobin A₂ Measurement by Cation-Exchange HPLC. **Clinical Chemistry**, v. 45, n. 8, p. 1317-1318, 1999.

DACIE, J. V.; LEWIS, S. M. **Practical Haematology**. 6.ed. London: Churchill, 1985.

DASH, S. Hb A₂ in Subjects with Hb D. **Clinical Chemistry**, v. 44, n. 11, p. 2381-2382, 1998.

DE MARCO, E. V. et al. Hb D-Iran [β 22(B4)GLU→GLN] in Southern Italy. **Hemoglobin**, v. 18, n. 1, p. 65-69, 1994.

DEVILLE, M. A. et al. Disruption of the Mechanism of Long Range Activation within the Human α -Globin Complex. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 21, p. 21793-21801, 2004.

EDINGTON, G.M.; LEHMANN, H. Haemoglobin G: A new haemoglobin found in a west African. **The Lancet**, v. 267, n. 6830, p. 173-174, 1954.

- FISHER, I. S et al. Validation of an Automated HPLC Method for Quantification of Hemoglobin S. **Clinical Chemistry**, v. 43, p. 1667-1669, 1997.
- FU, X. H.; LIU, D. P.; LIANG, C. C. Chromatin Structure and Transcriptional Regulation of the β -Globin Locus. **Experimental Cell Research**, v. 278, p. 1-11, 2002.
- HONIG, G. R.; ADAMS III, J.G. **Human Hemoglobin Genetics**. Springer-Verlag Wien: New York, 1986. 236 p.
- HUISMAN H. J. et al. HbVar: A Database of Human Hemoglobin Variants and Thalassemias. Summaries of mutation categories. Pennsylvania University USA and McMaster University in Canadá, 1996. Disponível em: <<http://globin.cse.psu.edu/>>. Acesso em 22 de julho de 2005.
- INSTRUCTION MANUAL OF BIO-RAD, Variante beta-Thalassemia Short Program Instruction Manual. Bio-Rad Laboratories, 1999.
- JOUTOVSKY, A.; HADZI-NESIC, J.; NARDI, M. A. HPLC Retention Time as a Diagnostic Tool for Hemoglobin Variants and Hemoglobinopathies: A Study of 60 000 Samples in a Clinical Diagnostic Laboratory. **Clinical Chemistry**, v. 50, p. 1736-1747, 2004.
- KRAUSS, J. S.; BURES, K.; KENIMER, E. Elution of Hemoglobin alfaMontgomery₂betaS₂ Hybrid Tetramers by the Variant Apparatus. **Clinical Chemistry**, v. 46, n. 1, p. 139-140, 2000.
- LEE, N. Y. et al. A Family Case beta-Thalassemia Minor and Hemoglobin Queens: alfa34 (B15) Leu-Arg. **Journal of Korean Medical Science**, v. 7, n. 4, p. 385-388, 1992.

LEHMANN, H.; VELLA, F. Hemoglobin Hasharon. **Humangenetik**, v. 25, p. 237-240, 1974.

LEONELI; G. G. **Hemoglobina D – Caracterização Eletroforética e Molecular**. São José do Rio Preto, 2001. 107 f. Dissertação (Mestrado em Genética) - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista.

LIBRARY OF ABNORMAL HEMOGLOBIN OF BIO-RAD, Variante beta-Thalassemia Short Program Library. Bio-Rad Laboratories, 1994.

LISOT, C. L. A.; SILLA, L. M. R. Triagem de hemoglobinopatias em doadores de sangue de Caxias do Sul, Rio Grande do Sul, Brasil: prevalência em área de colonização italiana. **Caderno de Saúde Pública**. v. 20, n. 6, p. 1595-1601, 2004.

MARENGO – ROWE, A. J. Rapid electrophoresis and quantitation of haemoglobin on cellulose acetato. **Journal of Clinical Pathology**, v. 18, n. 6, p. 790-792, 1965.

MATHEWS, C. K.; VAN HOLDE, K. E. Biochemistry. In_____. **Protein Function and Evolution**. California: The Benjamin/Cummings Publishing Company, 1990. p. 216-256.

NAOUM, P. C. et al. Hemoglobinopatias no Brasil. **Boletim**, v. 8, n. 141, p. 180-188, 1986.

NAOUM, P. C. **Eletroforese, técnicas e diagnósticos**. São Paulo: Santos, 1990. 174 p.

NAOUM, P. C. **Hemoglobinopatias e talassemias**. São Paulo: Sarvier, 1997.

NAOUM et al. HbD/Talassemia beta associada à anemia crônica. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 24, n. 1, p. 51-52, 2002.

OLD, J. M. Screening and genetic diagnosis of haemoglobin disorders. **Blood Reviews**, v. 17, p. 43-53, 2003.

ONDEI, L. S.; ZAMARO, P. J. A; BONINI-DOMINGOS, C. R. A importância do diagnóstico laboratorial clássico na identificação de variantes de hemoglobinas. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 27, n. 1, p. 72-74, 2005.

ORLANDO, G. M.; NAOUM, P. C.; BONINI-DOMINGOS, C.R. Diagnóstico laboratorial de hemoglobinopatias em populações diferenciadas. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 22, p. 111-121, 2000.

OU, C.; ROGNERUD, C. L. Diagnosis de hemoglobinopathies: eletrophoresis vs. HPLC. **Clinica Chimica Acta**, v. 313, p. 187-194, 2001.

PANIGRAHI, I. et al. Hb Q Índia: Is It Always Benign? **American Journal of Hematology**, v. 78, p. 245-246, 2005.

PAPAYANNOPOULOS, R.; STAMATOYANNOPOULOS, G. Stains for inclusions bodies. In_____. **Standardization of laboratory reagents and methods for detection of haemoglobinopathies**. Atlanta: Hew publications, 1974.

PENA, S. D. J. et al. DNA bioprints: simple non-isotopic DNA fingerprints with biotinnylated probes. **Electrophoresis**, v. 12, n. 2-3, p. 146-152, 1991.

PEREA, F. J. et al. 1999. Hb D-Los Angeles associated with Hb S or β -Thalassemia in four Mexican mestizo families. **Hemoglobin**, v. 23, n. 3, p. 231-237, 1999.

POLITIS-TSEGOS, C. et al. Homozygous Haemoglobin D Punjab. **Journal of Medical Genetics**, v. 12, p. 269-274, 1975.

RAHBAR, S. Haemoglobin D Iran: β_{22} Glutamic Acid $\rightarrow$ Glutamine (B_4). **British Journal of Haematology**, v. 24, n. 1, p. 31-35, 1973.

REIS, S. F.; PESSÔA, L. M.; STRAUSS, R. E. Application of size-free canonical discriminant analysis to studies of geographic differentiation. **Revista Brasileira de Genética**, v. 13, n. 3, p. 509-520, 1990.

RIBEIRO, M. L. et al. Hb Lepore-Baltimore ($\delta^{68\text{Leu}}\text{-}\beta^{84\text{Thr}}$) and Lepore-Washington-Boston ($\delta^{87\text{Gln}}\text{-}\beta^{\text{IVS-II-8}}$) in Central Portugal and Spanish Alta Extremadura. **Human Genetics**, v. 99, p. 669-673, 1997.

ROA, D.; TURNER, E. A.; AGUINAGA, M. D. P. Reference Ranges for Hemoglobin Variants by HPLC in African Americans. **Annals of Clinical and Laboratory Science**, v.25, p.228-235, 1995.

ROPERO, P. et al. Identification of the Hb Lepore phenotype by HPLC. **Haematologica**, v. 84, n. 12, p. 1081-1084, 1999.

ROPERO, P.; VILLEGAS, A., GONZÁLEZ, F. A. Hemoglobinopatía Korle-Bu [$\beta_{73}(\text{E17})\text{Asp}\rightarrow\text{Asn}$]. Primeiros casos descritos en España. **Medicina Clínica (Barcelona)**, v. 123, n. 7, p. 260-261, 2004.

SCHNEIDER, R. G. et al. Differentiation of eletrophoretically hemoglobins – such as S, D, G and P or A₂, C, E, and O- by electrophoresis of the globin chains. **Clinical Chemistry**, v. 20, p. 1111-1115, 1974.

SCHNOG, J. B. et al. Sickel cell disease, a general overview. **The Netherlands Journal of Medicine**, v. 62, n. 10, p. 364-374, 2004.

SERJEANT, G. R. Sickel cell disease. **Lancet**, v. 350, p. 725-730, 1997.

SHOKRANI, M.; TURNER, F. T. E. A.; AGUINAGA, M. D. P. Cromatographic Measurements of Hemoglobin A₂ in Blood Samples that Contain Sickel Hemoglobin. **Annals of Clinical and Laboratory Science**, v. 30, p.191-194, 2000.

SILVESTRONI, E.; BIANCO, I. Screening for microcytemia in Italy: analyses of data collected in the past 30 years. **American Journal of Human Genetics**, v. 27, n. 2, p. 198-212, 1975.

STRACHAN, T.; READ, A. P. **Genética Humana Molecular**. 2.ed. Porto Alegre: Artmed Editora, 2002. 578 p.

STAMATOYANNOPOULOS, G. et al. **The Molecular Basis of Blood Disease**. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 1994. 986 p.

STAMATOYANNOPOULOS, G. Control of globin gene expression during development and erythroid differentiation. **Experimental Hematology**, v. 33, p. 259-271, 2005.

THORNBURG, C. D. et al. An infant with homozygous hemoglobin D-Iran. **Journal of Pediatric Hematology/Oncology**, v. 23, n. 1, p. 67-68, 2001.

TRONCO, M. N.; VALÊNCIO, C. R. **Implementação de Recursos de Visualização e Interação em Ferramenta *Data Mining***. São José do Rio Preto, 2003. 56f. Monografia (Bacharelado em Ciências da Computação) - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista.

VELLA, F. Acid agar gel electrophoresis of human hemoglobins. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 49, n. 3, p. 440-442, 1968.

VIPRAKASIT, V. et al. Complex interactions of $\delta\beta$ hybrid haemoglobin (Hb Lepore-Hollandia) Hb E ($\beta^{26\text{G}\rightarrow\text{A}}$) and α^+ thalassemia in a Thai family. **European Journal of Haematology**, v. 68, p. 107-111, 2002.

WADA, Y. Advanced analytical methods for hemoglobin variants. **Journal of Chromatography B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 781, p. 291-301, 2002.

WAJCMAN, H. et al. Hemoglobine D Los Angeles Mise en Evidence de L'Anomalie de Structure Par Une Amelioration Des Methodes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 188, p. 55-58, 1969

WAJCMAN, H. et al. Abnormal Hemoglobins: Laboratory Methods. **Hemoglobin**, v. 25, n. 2, p. 169-181, 2001.

WEATHERALL, D. J.; CLEGG, J. B., Inherited haemoglobin disorders: an increasing global health problem. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 79, n. 8, p. 704-712, 2001.

WENNING, M. R. S. C. et al. α - Globin genes: thalassemic and structural alterations in a Brazilian population. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, n. 9, p. 1041-1045, 2000.

WILKINSON, T. et al. Detection of Variants of Haemoglobin D in Australia: Haemoglobin D Camperdown $\alpha_2^A\beta_2^{121\text{Glu}\rightarrow\text{Val}}$ and Haemoglobin D Punjab $\alpha_2^A\beta_2^{121\text{Glu}\rightarrow\text{Gln}}$. **The Medical Journal of Australia**, v. 26, p. 636-637, 1974.

ZAGO, M. A.; COSTA, F. F.; BOTTURA, C. Thalassemia intermedia in a family with beta⁰-thalassemia and Hb Hasharon. **Journal of Medical Genetics**, v. 19, p. 437-440, 1982.

ZAGO, M. A.; COSTA, F. F. Hereditary haemoglobin disorders in Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 79, p. 385-388, 1985.

ZAGO, M. A.; COSTA, F. F. Hb D-Los Angeles in Brazil: Simple Heterozygotes and Associations with β -Thalassemia and with Hb S. **Hemoglobin**, v. 12, n. 4, p. 399-403, 1988.

ZAMARO, P. J. A.; CANALLI, A. A.; SILVA JR, W. A.; BONINI-DOMINGOS, C. R. Diagnóstico laboratorial de hemoglobinas semelhantes à Hb S. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 38, n. 4, p. 261-266, 2002.

ZAR, J.H. **Biostatistical Analysis**. 4.ed. New Jersey: Prentice Hall, 1999. 663p.

ZURBRIGGEN, K. et al. Analysis of Minor Hemoglobins by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Fight Mass Spectrometry. **Clinical Chemistry**, v. 51, n. 6, p. 989-996, 2005.

8 Anexos

Tabela 2: Resultados dos testes de triagem para hemoglobinopatias das suspeitas fenotípicas mutantes de cadeia beta.

Registro	RO	ME	Alcalina	Neutra	Ácida	RET	Heinz	ACB	HPLC	EC	Suspeita
PL094	-	+/++	AS	-	AA	2	-	-	41.4 %	aA/bA/bmut	Hb Korle-Bu
AR 032	-	N/+	AS	-	AA	*	-	-	47.5 %	aA/bA/bmut	Hb Korle-Bu
AR 214	-	N/+	AS	-	AA	*	-	-	43.7 %	aA/bA/bmut	Hb Korle-Bu
PL001	-	N/+	ASH	-	AA	*	-	-	38.1 %	aA/bA/bmut	Hb Korle-Bu
PL103	-	+	ASH	2	AA	0.8	+	-	39.2 %	aA/bA/bmut	Hb Korle-Bu
PL141	-	+	ASH	0.5	AA	0.5	-	-	39.8 %	aA/bA/bmut	Hb Korle-Bu
PL170	-	+	ASH	0.5	AA	1.4	-	RAROS	40.5 %	aA/bA/bmut	Hb Korle-Bu
PL152	-	N/+	ASH	0.5	AA	0.6	-	SUG	37.9 %	aA/bA/bmut	Hb Korle-Bu+alfa talassemia
AR 142	-	+	ASH	2.5	AA	*	-	+	42.2 %	aA/bA/bmut	Hb Korle-Bu+alfa talassemia
AR 143	-	N/+	ASH	1.5	AA	*	-	+	42.0 %	aA/bA/bmut	Hb Korle-Bu+alfa talassemia
PL085	-	+	AS	-	AA	3	-	-	31.3 %	aA/bA/bmut	Hb Korle-Bu
PL182	-	+/++	AS	-	AA	1	-	-	38.4 %	aA/bA/bmut	Hb Korle-Bu
PL102	-	+/++	ASF	-	FA	*	*	*	13.4 %	aA/bA/bmut	Hb Korle-Bu
AR 215	-	N/+	AFS	-	AF	1	-	-	28.9 %	aA/bA/bmut	Hb Korle-Bu
PL089	-	++	AFSH	0.5	AF	2.5	-	+	29.0 %	aA/bA/bmut	Hb Korle-Bu
AR 141	-	N/+	ASH	2	AA	*	-	+	37.6 %	aA/bA/bmut	Hb Korle-Bu+alfa talassemia
PL118	-	+	AS	-	AA	1	-	-	35.8 %	aA/bA/bmut	Hb D Los Angeles
PL147	-	+	AS	-	AA	*	-	-	33.3 %	aA/bA/bmut	Hb D Los Angeles
PL198	-	N/+	ASH	0.5	AA	1.5	+	-	37.4 %	aA/bA/bmut	Hb D Los Angeles
PL124	-	N/+	AS	-	AA	*	-	-	38.5 %	aA/bA/bmut	Hb D Los Angeles
PL159	-	+	AS	-	AA	1.5	-	-	39.6 %	aA/bA/bmut	Hb D Los Angeles
PL023	-	N/+	AS	-	AA	*	*	*	38.0 %	aA/bA/bmut	Hb D Los Angeles
PL104	-	+	AS	-	AA	*	*	*	37.7 %	aA/bA/bmut	Hb D Los Angeles
PL107	-	+	AS	-	AA	0.8	-	-	36.4 %	aA/bA/bmut	Hb D Los Angeles
PL114	-	+	AS	-	AA	0.9	-	-	33.9 %	aA/bA/bmut	Hb D Los Angeles
PL121	-	+	AS	0.5	AA	0.8	-	-	34.7 %	aA/bA/bmut	Hb D Los Angeles
PL043	-	+	ASH	0.5	AA	0.3	-	-	37.8 %	aA/bA/bmut	Hb D Los Angeles
PL066	-	N/+	ASH	1	AA	0.6	-	-	38.7 %	aA/bA/bmut	Hb D Los Angeles
PL076	-	+	ASH	5	AA+F	*	+	-	38.0 %	aA/bA/bmut	Hb D Los Angeles
PL105	-	N/+	ASH	0.5	AA	*	*	*	37.8 %	aA/bA/bmut	Hb D Los Angeles
PL120	-	+	ASH	1	AA	1.1	-	-	35.2 %	aA/bA/bmut	Hb D Los Angeles

Continuação da Tabela 2: Resultados dos testes de triagem para hemoglobinopatias das suspeitas fenotípicas mutantes de cadeia beta.

Registro	RO	ME	Alcalina	Neutra	Ácida	HPLC	EC	Suspeita
PL119	-	+	ASH	0.5	AA	32.4% 4.21 RT	aA/bA/bmut	Hb D Los Angeles+alfa talassemia
PL027	-	N/+	ASH	2	AA	37.8% 4.32 RT	aA/bA/bmut	Hb D Los Angeles+alfa talassemia
PL097	-	N/+	ASH	0.5	AA	37.0% 4.30RT	aA/bA/bmut	Hb D Los Angeles+alfa talassemia
PL008	-	N/+	ASH	-	AA	41.5% 4.31 RT	aA/bA/bmut	Hb D Los Angeles+alfa talassemia
PL143	-	+/++	ASH	0.3	AA+F	26.5% 4.18 RT	aA/bA/bmut	Hb D Los Angeles
PL117	-	+	ASF	-	AA+F	32.2 % 4.18 RT	aA/bA/bmut	Hb D Los Angeles
PL110	-	+/++	AS	-	AF	34.8% 4.25 RT	aA/bA/bmut	Hb D Los Angeles
PL148	-	+	AS	-	AA	32.8% 4.17 RT	aA/bA/bmut	Hb D Los Angeles
PL197	-	+	ASHF	0.3	AA+F	37.5% 4.28 RT	aA/bA/bmut	Hb D Los Angeles+alfa talassemia
PL160	-	+	Adiminuído+S	-	AA	84.1% 4.27 RT	aA/bA/bmut	Hb D Los Angeles+Hb Korle Bu
PL162	+	++	SSF	-	AS	42.6% 4.22 RT	aA/bA/bmut	Hb D Los Angeles+Hb S
PL022	-	+	ASH	0.5	AA	48.0% 3.86 RT	aA/bA/bmut	Hb D Iran
PL080	-	+	ASH	2	AA	39.2% 3.82 RT	aA/bA/bmut	Hb D Iran
AR148	-	+	ASH	-	AA	47.6% 3.70 RT	aA/bA/bmut	Hb D Iran
AR158	-	+	ASH	-	AA	45.3% 3.76 RT	aA/bA/bmut	Hb D Iran
PL039	-	+	ASH	0.5	AA	50.0% 3.86RT	aA/bA/bmut	Hb D Iran+alfa talassemia
AR147	-	N/+	ASH	0.5	AA	46.0% 3.70 RT	aA/bA/bmut	Hb D Iran+alfa talassemia
PL081	-	+	AFS	-	FA	17.2% 3.80 RT	aA/bA/bmut	Hb D Iran
PL193	-	+	ASH	0.5	AA	44.0% 3.86RT	aA/bA/bmut	Hb D Iran+alfa talassemia
PL192	-	N/+	FSAH	0.5	F+fração próxima de A	11.0% 3.83RT	aA/bA/bmut	Hb D Iran+alfa talassemia
AR036	+	+	AS	-	AA	34.9% 4.47 RT	aA/bA/bmut	Sem suspeita
AR075	-	N/+	AS	-	AA	37.6% 4.47 RT	aA/bA/bmut	Sem suspeita
PL017	-	+/++	AS	-	AA	21.1% 4.56 RT	aA/bA/bmut	Sem suspeita
AR097	-	N/+	AS	-	AA	36.2% 4.58 RT	aA/bA/bmut	Sem suspeita
AR149	+	++	ASH	0.5	AS	16.8% 4.54 RT	aA/bA/bmut	Sem suspeita+alfa talassemia
AR184	-	+	A+fração próxima de S	-	A + fração próxima de S	13.5% 4.55 RT	aA/bA/bmut	Sem suspeita
AR079	-	N/+	A+fração próxima de S	-	AS	35.7% 4.67 RT	aA/bA/bmut	Sem suspeita
AR100	-	+	A+fração próxima de S+H	1	AS	35.3% 4.64 RT	aA/bA/bmut	Sem suspeita+alfa talassemia
PL087	-	+	FA+fração próxima de S+H	1	FA	27.6 % 1.76 RT	aA/bA/bmut	Sem suspeita

Legenda:

RO: Resistência globular osmótica em solução de NaCl a 0.36%;

ME: Análise da morfologia eritrocitária;

Alcalina: Eletroforese em acetato de celulose em pH alcalino;

Neutra: Eletroforese em acetato de celulose em pH neutro;

Ácida: Eletroforese em gel de ágar em pH ácido;

RET: Reticulócitos;

Heinz: Pesquisa de corpúsculos de Heinz;

ACB: Pesquisa de agregados de Hb H;

HPLC: valor percentual e tempo de retenção, obtido por HPLC, da fração de Hb variante;

EC: eletroforese de cadeias polipeptídicas em acetato de celulose em pH alcalino;

aA/bA/bmut: cadeia alfa normal, cadeia beta normal e cadeia beta variante

*: teste não realizado

SUG: sugestivo

INC: inconclusivo

Tabela 3: Resultados dos testes de triagem para hemoglobinopatias das suspeitas fenotípicas mutantes de cadeia alfa.

Registro	RO	ME	Alcalina	Neutra	Ácida	RET	Heinz	ACB	HPLC	EC	Suspeita	
PL058	-	N/+	AS	-	A+fração difusa em S	2	-	-	29.6%	4.79 RT	aA/bA/amut	Hb Hasharon
PL129	-	+	AS	0.5	A+fração difusa em S	0.6	-	-	26.1%	4.82 RT	aA/bA/amut	Hb Hasharon
ARI38	-	N/+	AS	-	A+fração difusa em S	*	-	-	27.6%	4.80 RT	aA/bA/amut	Hb Hasharon
PL003	-	N/+	ASH	1	A+fração difusa em S	2.5	-	INC	21.0%	4.80 RT	aA/bA/amut	Hb Hasharon
ARI78	-	+	ASH	-	AS	*	-	-	25.6%	4.80 RT	aA/bA/amut	Hb Hasharon
PL116	-	+	ASH	-	A+fração difusa em S	0.6	-	-	31.8%	4.81 RT	aA/bA/amut	Hb Hasharon
PL199	-	N/+	ASH	0.5	A+fração difusa em S	0.8	-	-	20.8%	4.84 RT	aA/bA/amut	Hb Hasharon
PL163	-	N/+	ASH	1	AS	*	-	-	28.3%	4.80 RT	aA/bA/amut	Hb Hasharon
PL183	+	+/++	ASH	0.3	A+fração difusa em S	0.7	+	-	28.8%	4.81 RT	aA/bA/amut	Hb Hasharon
PL172	-	+/++	ASH	0.8	AS	0.7	-	-	24.0%	4.83 RT	aA/bA/amut	Hb Hasharon
PL083	-	+/++	AS	-	AS	1	-	-	26.2%	4.81 RT	aA/bA/amut	Hb Hasharon
PL156	-	+	ASH	0.3	A+fração difusa em S	1.1	-	-	26.1%	4.81 RT	aA/bA/amut	Hb Hasharon+alfa talassemia
PL205	-	+	ASH	0.5	A+fração difusa em S	1.5	-	+	29.2%	4.84 RT	aA/bA/amut	Hb Hasharon+alfa talassemia
PL113	-	+	ASH	1	A+fração difusa em S	0.8	-	+	26.6%	4.80 RT	aA/bA/amut	Hb Hasharon+alfa talassemia
PL138	-	N/+	ASH	0.5	A+fração difusa em S	0.6	-	+	24.9%	4.80 RT	aA/bA/amut	Hb Hasharon+alfa talassemia
PL167	-	+	ASH	1	AS	1	-	+	24.9%	4.80 RT	aA/bA/amut	Hb Hasharon+alfa talassemia
ARI90	-	+	ASH	0.5	A+fração difusa em S	*	-	+	25.7%	4.80 RT	aA/bA/amut	Hb Hasharon+alfa talassemia
PL048	-	N/+	ASH	1	A+fração difusa em S	*	-	+	25.7%	4.80 RT	aA/bA/amut	Hb Hasharon+alfa talassemia
PL049	-	N/+	AS	-	A+fração difusa em S	0.8	-	+	26.8%	4.81 RT	aA/bA/amut	Hb Hasharon+alfa talassemia
PL084	-	+/++	AS	-	F+fração difusa abaixo de F	*	-	-	4.3%	4.84 RT	aA/bA/amut	Hb Hasharon
PL200	-	N/+	AFS	1	A+fração difusa em S	0.7	-	-	6.7%	4.85 RT	aA/bA/amut	Hb Hasharon
PL128	-	+	F A S	0.5	FA	0.8	-	-	7.6%	4.84 RT	aA/bA/amut	Hb Hasharon
PL157	-	+	FAH + fração próxima de S	0.5	Fração difusa próxima de A	1	+	SUG	8.6%	4.83 RT	aA/bA/amut	Hb Hasharon+alfa talassemia
PL013	-	N/+	AF+2 frações abaixo de S+H	2	A+fração difusa em S	1	-	+	4.8%	4.83 RT	aA/bA/amut	Hb Hasharon+alfa talassemia
PL115	-	+	FA+fração próxima de S+H	1	AF+fração difusa em S	0.6	-	+	9.6%	4.82 RT	aA/bA/amut	Hb Hasharon+alfa talassemia
PL137	-	N/+	AF+fração próxima de S+H	0.5	A+fração difusa em S	0.6	+	+	6.9%	4.82 RT	aA/bA/amut	Hb Hasharon+alfa talassemia
PL166	-	+/++	AF+fração próxima de S+acima A	3.5	F	1.5	-	+	4.7%	4.82 RT	aA/bA/amut	Hb Hasharon+alfa talassemia
PL171	-	+	AF+fração próxima de S+H	1	Fa fração difusa em S	0.9	-	SUG	4.7%	4.85 RT	aA/bA/amut	Hb Hasharon+alfa talassemia
PL112	-	+	ASH	1	AS	1.5	-	+	26.2%	4.40 RT	aA/bA/amut	Tipo G+alfa talassemia
PL111	-	+	AFSH	0.5	AF+fração posição de S	0.7	-	INC	11.5%	4.28 RT	aA/bA/amut	Tipo G
AR225	-	N/+	ASF	-	AF+fração posição de S	*	-	-	13.5%	4.36 RT	aA/bA/amut	Tipo G

Continuação da Tabela 3: Resultados dos testes de triagem para hemoglobinopatias das suspeitas fenotípicas mutantes de cadeia alfa.

Registro	RO	ME	Alcalina	Neutra	Ácida		HPLC	EC	Suspeita	
PL054	-	N/+	AS	-	A+fração próxima de S+F	*	-	15.2% 4.57 RT	αA/βA/αmut	Hb Queens
AR175	-	+	AS	-	A + fração próxima de S	*	-	13.0% 4.66 RT	αA/βA/αmut	Hb Queens
AR176	-	+	AS	-	A + fração próxima de S	*	-	15.7% 4.64 RT	αA/βA/αmut	Hb Queens
PL 142	-	+	A+fração entre S e F	1	A + fração difusa em S	1.1	-	SUG 13.0% 4.48 RT	αA/βA/αmut	Hb Montgomery+alfa talassemia
PL086	-	N/+	ASH	1	A+fração posição de C	3	-	INC 15.0% 4.72 RT	αA/βA/αmut	Q - Índia
PL030	+	++	ASH	1	AA	*	+	38.1% 4.43 RT	αA/βA/αmut	Sem suspeita
PL045	-	N/+	AS	-	AF	2	-	29.7% 4.45 RT	αA/βA/αmut	Sem suspeita
PL051	-	+	AS	-	AA	*	-	20.7% 3.31 RT	αA/βA/αmut	Sem suspeita
PL079	-	+/++	ASH	0.5	AA	*	-	14.3% 3.34 RT	αA/βA/αmut	Sem suspeita
AR169	-	N/+	AS	-	AA	*	-	28.9% 4.47 RT	αA/βA/αmut	Sem suspeita
AR170	-	N/+	AFS + fração acima C	-	AF	*	-	18.9% 4.42 RT	αA/βA/αmut	Sem suspeita
AR157	-	N/+	ASH	1	A + fração próxima de S	*	-	27.9% 4.50 RT	αA/βA/αmut	Sem suspeita+alfa talassemia
AR076	-	+	AS	-	A + fração difusa próxima de S	*	-	33.8% 4.44 RT	αA/βA/αmut	Sem suspeita
AR036	+	+	AS	-	A + fração difusa próxima de S	*	-	24.5% 4.30 RT	αA/βA/αmut	Sem suspeita
AR187	-	N/+	ASH	-	AA	*	-	INC 15.4% 3.29 RT	αA/βA/αmut	Sem suspeita
AR188	+	+/++	AS + F + H	-	FA	*	-	9.6% 3.31 RT	αA/βA/αmut	Sem suspeita
PL134	-	+/++	ASH	0.5	AA+rastro abaixo de A	0.4	-	31.2% 4.37 RT	αA/βA/αmut	Sem suspeita
PL168	-	+/++	A+F+fração próxima de S+H	0.3	ASF	1	-	45.5% 1.20 RT	αA/βA/αmut	Sem suspeita+alfa talassemia
PL169	-	+	ASH	1	AA+rastro abaixo de A	2	-	25.0% 4.44 RT	αA/βA/αmut	Sem suspeita+alfa talassemia
PL184	-	+	AS+rastro nas anidrases	-	A+fração abaixo de A	2	-	14.0% 1.68 RT	αA/βA/αmut	Sem suspeita
PL194	-	+	A+fração próxima de S	-	AA	1.8	raros	8.9% 4.45 RT	αA/βA/αmut	Sem suspeita
PL196	-	+	ASH	0.5	AS difusa	1.5	-	22.6% 4.64 RT	αA/βA/αmut	Sem suspeita+alfa talassemia
PL204	-	N/+	AS	-	A+fração difusa abaixo de A	1	-	16.8% 4.62 RT	αA/βA/αmut	Sem suspeita
PL206	-	+/++	ASHF	0.3	A+fração difusa em S	1	-	14.8% 4.54 RT	αA/βA/αmut	Sem suspeita+alfa talassemia

Legenda:

RO: Resistência globular osmótica em solução de NaCl a 0,36%;

ME: Análise da morfologia eritrocitária;

Alcalina: Eletroforese em acetato de celulose em pH alcalino;

Neutra: Eletroforese em acetato de celulose em pH neutro;

Ácida: Eletroforese em gel de ágar em pH ácido;

RET: Reticulócitos;

Heinz: Pesquisa de corpúsculos de Heinz;

ACB: Pesquisa de agregados de Hb H;

HPLC: valor percentual e tempo de retenção, obtido por HPLC, da fração de Hb variante;

EC: eletroforese de cadeias polipeptídicas em acetato de celulose em pH alcalino;

$\alpha A/\beta A/\alpha mut$: cadeia alfa normal, cadeia beta normal e cadeia alfa variante

*: teste não realizado

SUG: sugestivo

INC: inconclusivo

Tabela 4: Resultados dos testes de triagem para hemoglobinopatias das suspeitas fenotípicas com fusão das cadeias delta/beta.

Registro	RO	ME	Alcalina	Neutra	Ácida	RET	Heinz	ACB	HPLC	EC	Suspeita
PL068	+	++	AS	-	AA	2	-	-	10.8% 3.44 RT	$\alpha\alpha/\beta\text{A}/\text{delta}$ beta	Hb Lepore
PL165	-	++	AS	-	AA+F	1.5	-	-	11.4% 3.5 RT	$\alpha\alpha/\beta\text{A}/\text{delta}$ beta	Hb Lepore
AR145	-	+ / ++	AS	-	AA+F	*	-	-	13.1% 3.49 RT	$\alpha\alpha/\beta\text{A}/\text{delta}$ beta	Hb Lepore
PL164	+	+ / ++	AS	0.3	AA+F	*	-	-	13.3% 3.52 RT	$\alpha\alpha/\beta\text{A}/\text{delta}$ beta	Hb Lepore
AR211	-	N/+	AS	-	AA+F	2	-	-	12.2% 3.45 RT	$\alpha\alpha/\beta\text{A}/\text{delta}$ beta	Hb Lepore
AR155	-	+	AS	-	AA+F	*	-	-	13.6% 3.51 RT	$\alpha\alpha/\beta\text{A}/\text{delta}$ beta	Hb Lepore
PL004	-	++	ASF	-	AA+F	*	-	-	12.5% 3.53 RT	$\alpha\alpha/\beta\text{A}/\text{delta}$ beta	Hb Lepore
PL132	-	+	ASFH	1	AA+F	0.6	+	-	10.0% 3.43 RT	$\alpha\alpha/\beta\text{A}/\text{delta}$ beta	Hb Lepore
PL133	-	+	ASFH	0.5	AA+F	0.5	-	-	11.5% 3.44 RT	$\alpha\alpha/\beta\text{A}/\text{delta}$ beta	Hb Lepore
PL210	-	+ / ++	ASF	-	AA+F	*	-	-	12.4% 3.56 RT	$\alpha\alpha/\beta\text{A}/\text{delta}$ beta	Hb Lepore
PL209	-	+	ASF	-	AA+F	1.5	-	-	11.0% 3.55 RT	$\alpha\alpha/\beta\text{A}/\text{delta}$ beta	Hb Lepore
PL034	+	++	ASH	1	AA+F	2	-	+	11.7% 3.42RT	$\alpha\alpha/\beta\text{A}/\text{delta}$ beta	Hb Lepore+alfa talassemia
AR034	-	+	ASH	0.5	AA+F	*	-	+	14.9% 3.51 RT	$\alpha\alpha/\beta\text{A}/\text{delta}$ beta	Hb Lepore+alfa talassemia
AR026	-	+	AS H	1	AA+F	3	-	+	14.2% 3.47 RT	$\alpha\alpha/\beta\text{A}/\text{delta}$ beta	Hb Lepore+alfa talassemia
AR112	-	N/+	ASFH	1	AA+F	0.7	-	+	11.7% 3.51 RT	$\alpha\alpha/\beta\text{A}/\text{delta}$ beta	Hb Lepore+alfa talassemia

Legenda:

RO: Resistência globular osmótica em solução de NaCl a 0.36%;

ME: Análise da morfologia eritrocitária;

Alcalina: Eletroforese em acetato de celulose em pH alcalino;

Neutra: Eletroforese em acetato de celulose em pH neutro;

Ácida: Eletroforese em gel de ágar em pH ácido;

RET: Reticulócitos;

Heinz: Pesquisa de corpúsculos de Heinz;

ACB: Pesquisa de agregados de Hb H;

HPLC: valor percentual e tempo de retenção, obtido por HPLC, da fração de Hb variante;

EC: eletroforese de cadeias polipeptídicas em acetato de celulose em pH alcalino;

$\alpha\text{A}/\beta\text{A}/\text{delta}$ beta: cadeia alfa normal, cadeia beta normal e cadeia variante com fusão das cadeias delta e beta

*: teste não realizado

Tabela 5: Valores percentuais das frações de Hb e tempos de retenção, obtidos por HPLC, das suspeitas fenotípicas mutantes de cadeia beta.

Registro	Suspeita		HPLC																	
	Unk1*	%	F		P2		P3		A0		A2		D		S		C		Unk2*	
			RT	%	RT	%	RT	%	RT	%	RT	%	RT	%	RT	%	RT	%	RT	%
PL094		0.7	1.04	0.9	1.12	3.4	1.34	5.7	1.7	34	2.6	0	0	41.4	4.15					
AR032				0.3	1.12	2.7	1.34	4.6	1.9	44.8	2.43	0	0	47.5	4.05					
AR214		2.5	1.8	1.1	1.08	3.1	1.31	3.3	1.7	46.2	2.71	0	0	43.7	4.16					
PL001		2.1	1.72	0.9	1.11	3	1.34	2.5	1.9	53.5	2.61	0	0	38.1	4.06					
PL103		2.7	1.82	1	1.1	3.5	1.33	3.2	1.7	50.2	2.56	0	0	39.2	4					
PL141				0.5	1.09	3.6	1.32	5.5	1.8	50.5	2.54	0	0	39.8	3.99					
PL170		4.9	2.09	0	0	4.7	1.32	2.8	1.7	46.5	2.48	0	0	40.5	4.2					
PL152		2.5	1.82	1.2	1.08	3.4	1.32	5.1	1.7	49.9	2.44	0	0	37.9	3.93					
AR142		2	1.8	1.2	1.08	2.9	1.32	3.4	1.7	48	2.64	0	0	42.2	4.08					
AR143		2	1.8	1.3	1.08	3	1.32	4	1.7	47.6	2.64	0	0	42	4.1					
PL085				1.8	1.11	4.3	1.34	9.6	1.7	53.3	2.5	0	0	31.3	3.96					
PL182				1.6	1.1	3.8	1.34	6.2	1.8	49.9	2.53	0	0	38.4	3.92					
PL102		0.5	1.82	66.1	1.24	0	0	1.2	1.7	13	2.55	0	0	13.4	3.94					
AR215		3.3	2.28	34.9	1.2	0	0	5.4	1.7	25.3	2.67	0	0	28.9	4.09					
PL089		1.9	1.86	14.8	1.18	3.1	1.34	5.8	1.7	33.7	2.6	0	0	29	4.1				7	2.3
AR141		3	1.8	1.6	1.08	4.6	1.32	4.8	1.7	48.3	2.63	0	0	37.6	4.04					
PL118				0.6	1.13	4.1	1.33	3.7	1.7	55.9	2.52	0	0	35.8	4.22					
PL147				0.5	1.08	4.7	1.3	3.2	1.7	58.3	2.44	0	0	33.3	4.16					
PL198		0.9	1.47	0.3	0.94	4.2	1.34	6.2	1.7	50.9	2.5	0	0	37.4	4.21					
PL124		0.5	1.24	0	0	3.3	1.32	2.6	1.7	55.1	2.41	0	0	38.5	4.14					
PL159				0.2	0.94	4.2	1.33	4.6	1.7	51.5	2.48	0	0	39.6	4.24					
PL023		3	2.11	0.4	1.14	3.6	1.35	2.3	1.7	51.5	2.6	1.3	3.72	38	4.3					
PL104		2.5	2.08	0.7	1.12	3.3	1.33	2.2	1.7	52.3	2.57	1.3	3.67	37.7	4.26					
PL107		3.6	2.1	0.4	1.14	3.9	1.34	2.6	1.7	52.3	2.49	0.9	3.73	36.4	4.24					
PL114				0.4	1.12	4	1.33	3.2	1.7	57.8	2.54	0.8	3.71	33.9	4.23					
PL121		4.4	2.1	0.6	1.13	4.4	1.33	3.2	1.7	51.8	2.52	1	3.7	34.7	4.22					
PL043		2.5	2.09	0.6	1.14	3.6	1.34	2.3	1.7	52.1	2.64	1.1	3.7	37.8	4.3					
PL066		2.2	2.09	0.3	1.13	3.5	1.34	2.2	1.7	51.4	2.66	1.2	3.7	38.7	4.32					
PL076		2.7	2.06	1.2	1.11	3.5	1.32	2.3	1.7	51	2.58	1.2	3.64	38	4.25					

Continuação da Tabela 5: Valores percentuais das frações de Hb e tempos de retenção, obtidos por HPLC, das suspeitas fenotípicas mutantes de cadeia beta.

Registro	Suspeita	HPLC																		
		Unk1	F		P2		P3		A0		A2		D		S		C		Unk2	
		%	RT	%	RT	%	RT	%	RT	%	RT	%	RT	%	RT	%	RT	%	RT	%
PL105	Hb D Los Angeles	2.2	2.08	1.3	1.12	2.9	1.33	2	1.7	52.2	2.58	1.6	3.67	37.8	4.25					
PL120	Hb D Los Angeles			0.5	1.14	3.8	1.34	3.3	1.7	56.5	2.52	0.8	3.72	35.2	4.22					
PL119	Hb D Los Angeles+alfa talassemia			0.4	1.13	4.5	1.34	3.2	1.7	58.4	2.52	1	3.7	32.4	4.21					
PL027	Hb D Los Angeles+alfa talassemia	3.2	2.11	0	0	4.3	1.35	3	1.7	50.6	2.64	1.2	3.73	37.8	4.32					
PL097	Hb D Los Angeles+alfa talassemia	2.9	2.08	0.4	1.12	3.4	1.33	2.4	1.7	51.5	2.6	1.6	3.69	37	4.3					
PL008	Hb D Los Angeles+alfa talassemia	2.4	2.07	0.6	1.14	3.4	1.33	1.4	1.7	49.5	2.65	1.1	3.7	41.5	4.31					
PL143	Hb D Los Angeles			8.8	1.15	3.7	1.33	3.4	1.7	56.6	2.5	0.8	3.68	26.5	4.18			0.6	5.26	
PL117	Hb D Los Angeles			7.9	1.14	3.4	1.34	3.2	1.7	52.7	2.5	0	0	32.2	4.18					
PL110	Hb D Los Angeles	2.7	2.07	3.2	1.14	3.8	1.33	3.4	1.7	50.1	2.56	1.7	3.66	34.8	4.25					
PL148	Hb D Los Angeles			1.6	1.2	3.4	1.3	3.1	1.7	58.3	2.45	0.8	3.66	32.8	4.17					
PL 197	Hb D Los Angeles+alfa talassemia			13.1	1.22	2.9	1.39	2.1	1.8	44.4	2.6	0	0	37.5	4.28					
PL160	Hb D Los Angeles+Hb Korie Bu	0.6	1.22	1.1	1.12	0.6	1.33	0.7	1.7	8.6	2.5	0	0	84.1	4.27					
PL162	Hb D Los Angeles+Hb S	2.5	2.3	2.4	1.09	0	0	0	0	3.4	2.04	0	0	42.6	4.22	47.9	4.53	1	2.8	
PL022	Hb D Iran			0.8	1.12	3.2	1.32	4.4	1.8	45.9	2.56	48.4	3.86							
PL080	Hb D Iran	0.8	1.06	0.8	1.14	3.8	1.34	9.1	1.7	39.7	2.49	39.2	3.82							
AR148	Hb D Iran	1.5	1.69	0.8	1.1	2.4	1.32	3	1.6	43.3	2.65	47.6	3.7							
AR158	Hb D Iran	2.2	1.73	1.1	1.11	2.9	1.32	3.1	1.6	45.3	2.71	45.3	3.76							
PL039	Hb D Iran+alfa talassemia			0.5	1.12	3.2	1.32	4.4	1.8	44.6	2.56	50	3.86							
AR147	Hb D Iran+alfa talassemia	0.1	0.91	0.4	1.1	2.9	1.32	3.4	1.6	43.1	2.64	46	3.7							
PL081	Hb D Iran	1.9	2.28	64.5	1.25			1.8	1.7	14.1	2.56	17.2	3.8							
PL193	Hb D Iran+alfa talassemia	0.7	1.46	2	1.08	3.1	1.32	8.8	1.7	45.9	2.46	44.4	3.86							
PL192	Hb D Iran+alfa talassemia			77.9	1.2			0.6	1.7	7	2.5	10.5	3.83							

Legenda:

%: valor percentual da fração de Hb

RT: tempo de retenção da fração de Hb em minutos

*Unk1 e Unk2: Frações de Hb desconhecidas

Tabela 6: Valores percentuais das frações de Hb e tempos de retenção, obtidos por HPLC, das suspeitas fenotípicas mutantes de cadeia alfa.

Registro		Suspeita		HPLC													
		Unk1	F	P2	P3	A0	A2	D	S	Unk2	Unk3	Unk4					
		%	RT	%	RT	%	RT	%	RT	%	RT	%	RT				
PL058	Hb Hasharon	29.6	4.8	0.4	1.11	4.4	1.31	3.1	1.67	59.5	2.59	1.9	3.57	1	4.2		
PL129	Hb Hasharon	1.6	4.7	0.3	0.96	5	1.34	7.2	1.69	57.3	2.52	1.9	3.67	0.6	4.3	26	4.82
AR138	Hb Hasharon	26.7	4.8	0.3	0.95	4.3	1.32	5.8	1.65	58.9	2.65	2.1	3.62	0.7	4.3	1.4	4.64
PL003	Hb Hasharon	21	4.8	0.2	0.95	4.4	1.3	5.3	1.65	65.9	2.6	2.5	3.62	0.7	4.6		
AR178	Hb Hasharon	25.6	4.8	0.9	1.1	4.5	1.31	3.2	1.72	62.8	2.64	2.1	3.61	0.8	4.2		
PL116	Hb Hasharon	26.6	4.8	0.7	1.14	4.7	1.34	3.5	1.69	61.9	2.5	2.1	3.61	0.6	4.3		
PL199	Hb Hasharon	20.8	4.8	0	0	5.5	1.35	4.4	1.74	67.2	2.52	2.2	3.7				
PL163	Hb Hasharon	0.9	1.4	0.7	1.09	4	1.3	4.2	1.67	59.2	2.51	2	3.58	0.9	4.2	28	4.8
PL183	Hb Hasharon	28.8	4.8	0.6	1.12	4.3	1.32	3.4	1.73	59.7	2.44	2	3.68	0.8	4.3		
PL172	Hb Hasharon	1.8	4.7	0.3	0.93	5.3	1.33	9.3	1.69	56.9	2.51	2	3.71	0.5	4.4	24	4.83
PL083	Hb Hasharon	0.3	1	0.5	1.13	4	1.34	7	1.68	57.9	2.66	1.6	3.66	0.7	4.2	1.9	4.65
PL156	Hb Hasharon+alfa talassemia	0.2	0.9	0.7	1.12	3.8	1.32	6.2	1.68	59.7	2.47	2.1	3.66	0.6	4.3	0.8	4.67
PL205	Hb Hasharon+alfa talassemia	29.2	4.8	0		5.2	1.37	3.6	1.77	58.4	2.58	2	3.73				
PL113	Hb Hasharon+alfa talassemia	0.8	1.5	0.8	1.12	3.3	1.33	4.8	1.68	56	2.48	1.8	3.64	0.7	4.3	32	4.81
PL138	Hb Hasharon+alfa talassemia	1.5	4.7	0.3	0.94	4.8	1.32	7.8	1.66	58.1	2.44	2.2	3.62	0.7	4.3	25	4.8
PL167	Hb Hasharon+alfa talassemia	24.9	4.8	1	1.11	4.6	1.3	6.8	1.63	59	2.51	2	3.58	0.8	4.2	1.2	4.64
AR190	Hb Hasharon+alfa talassemia	25.7	4.8	0.6	0.95	4.6	1.32	8.9	1.66	54.8	2.62	2	3.66	0.6	4.3	2.6	4.64
PL048	Hb Hasharon+alfa talassemia	25.7	4.8	0		4.9	1.32	3.2	1.66	63.4	2.61	2.2	3.58	0.7	4.2		
PL049	Hb Hasharon+alfa talassemia	0.3	1	1.4	1.14	3.4	1.34	6.1	1.68	56.8	2.52	2.4	3.64	0.8	4.3	0.8	1.48
PL084	Hb Hasharon	0.9	1.2	54.2	1.24			2.7	1.84	10.9	2.58	21.7	3.54			0.5	2.17
PL200	Hb Hasharon	6.7	4.9	49.6	1.22			3.2	1.84	24.3	2.52	13.6	3.56				
PL128	Hb Hasharon	2	1.7	47.8	1.24			2.3	1.86	18.3	2.52	20.6	3.61			7.6	4.84
PL157	Hb Hasharon+alfa talassemia	2.1	1.8	43.8	1.22			2.6	1.69	21.6	2.48	21.7	3.61			0.6	4.68
PL013	Hb Hasharon+alfa talassemia	1.4	1.7	49.9	1.23			2.7	1.86	9.6	2.5	13.6	3.6			2.1	2.24
PL115	Hb Hasharon+alfa talassemia	1.5	1.7	43.1	1.23			2.6	1.84	20.7	2.46	20.6	3.58			2.1	4.83
PL137	Hb Hasharon+alfa talassemia	1.9	1.7	52.7	1.22			2.6	1.84	16.9	2.43	21.7	3.58			9.6	4.82
PL166	Hb Hasharon+alfa talassemia	1.9	1.6	51.4	1.22			3.2	1.82	12.2	2.42	13.6	3.56			6.9	4.82
PL171	Hb Hasharon+alfa talassemia	2.1	1.9	50.7	1.22			2.4	1.7	13.5	2.52	20.6	3.65			4.7	4.82
PL112	Tipo G+alfa talassemia	0.2	1	0.2	0.93	4.8	1.3	8.1	1.62	59.8	2.48	0.7	3.56			0.6	4.68
														26	4.4	5	4.85

Continuação da Tabela 6: Valores percentuais das frações de Hb e tempos de retenção, obtidos por HPLC, das suspeitas fenotípicas mutantes de cadeia alfa.

Registro	Suspeita	HPLC																				
		Unk1		F		P2		P3		A0		A2		D		S		C		Unk2		
		%	RT	%	RT	%	RT	%	RT	%	RT	%	RT	%	RT	%	RT	%	RT	%	RT	%
PL111	Tipo G			37.5	1.2			4.3	1.63	42.9	2.38			12	4.3							
AR225	Tipo G	15.1	2.3	35.8	1.18			4.7	1.66	28.6	2.64					14	4.36					
PL054	Hb Queens	0.2	1.1	0.3	0.96	4.8	1.33	9	1.66	65.2	2.59	4.5	3.7			15	4.57					
AR175	Hb Queens			1.7	1.14	4.7	1.34	4.5	1.7	72.7	2.63	3.4	3.69			13	4.66					
AR176	Hb Queens	0.4	4.4	0.3	0.96	5	1.33	4.8	1.69	70.8	2.62	3.1	3.69			16	4.64					
PL 142	Hb Montgomery+alfa talassemia			0.6	1.11	6	1.32	4.6	1.69	74	2.5	1.9	3.61			13	4.48					
PL086	Q - India			0.2	0.95	4.7	1.32	5.5	1.66	71.8	2.52	2.7	3.62			15	4.72					

Legenda:

%: valor percentual da fração de Hb
RT: tempo de retenção da fração de Hb em minutos
*Unk1, Unk2, Unk3 e Unk 4: Frações de Hb desconhecidas

Tabela 7: Valores percentuais das frações de Hb e tempos de retenção, obtidos por HPLC, das suspeitas fenotípicas com fusão das cadeias delta/beta.

Registro	Suspeita		HPLC											
	Unk 1	%	F		P2		P3		A0		A2		S	
			RT	%	RT	%	RT	%	RT	%	RT	%	RT	%
PL068				1.2	1.11	4.2	1.32	4	1.64	80.4	2.52	10.8	3.44	
PL165				7.7	1.14	5.1	1.31	5	1.68	72	2.49	11.4	3.5	
AR145		1.1	2.04	5.3	1.14	4.4	1.3	10	1.63	65.1	2.6	13.1	3.49	0.6
PL164		0.5	5.32	2.9	1.11	6	1.31	5	1.68	74.1	2.49	13.3	3.52	
AR211		0.4	0.94	2.5	1.12	4.1	1.3	9	1.64	70.9	2.68	12.2	3.45	
AR155				3.9	1.12	4.5	1.31	6	1.65	70.8	2.58	13.6	3.51	0.6
PL004				3.2	1.13	5.1	1.34	7	1.68	72.4	2.6	12.5	3.53	
PL132				6.1	1.14	9.8	1.3	9	1.62	65.7	2.54	10	3.43	
PL133				3.6	1.13	6	1.3	6	1.64	73.4	2.56	11.5	3.44	
PL210				3.9	1.13	5.9	1.33	6	1.7	73	2.55	12.4	3.56	
PL209				9.9	1.16	5.3	1.33	6	1.7	68.8	2.55	11	3.55	
PL034				2.1	1.08	4.8	1.28	7	1.61	73.6	2.58	11.7	3.42	
AR034	1		4.7											
AR026				2.7	1.11	4.3	1.34	4	1.68	75.1	2.39	14.9	3.51	1.1
AR112				6	1.14	3.6	1.34	5	1.67	72.5	2.37	14.2	3.47	
				7.1	1.14	4	1.32	10	1.66	66	2.62	11.7	3.51	

Legenda:

%; valor percentual da fração de Hb
RT: tempo de retenção da fração de Hb em minutos
*Unk1, Unk2 e Unk3: Frações de Hb desconhecidas.

Este artigo será submetido à Annals of Clinical & Laboratory Science

ISSN: 0091-7370

Fator de Impacto: 0,96

ANÁLISE DE HEMOGLOBINA S (Hb S) POR HPLC PARA O ESTABELECIMENTO DE VALORES REFERENCIAIS COM AUXÍLIO DA ESTATÍSTICA E INFORMÁTICA

Luciana de Souza Ondeí¹; Paula Juliana Antoniazco Zamaro¹; Fabrício Barreto Teresa²; Paulo Henrique Mangonaro³; Carlos Roberto Valêncio³; Claudia Regina Bonini-Domingos¹

1- UNESP/IBILCE – Câmpus de São José do Rio Preto – Laboratório de Hemoglobinas e Genética das Doenças Hematológicas – Departamento de Biologia.

2- UNESP/IBILCE – Câmpus de São José do Rio Preto – Laboratório de Comportamento Animal – Departamento de Zoologia e Botânica.

3- UNESP/IBLCE – Câmpus de São José do Rio Preto – Laboratório de Banco de Dados – Departamento de Ciências da Computação e Estatística.

Resumo

Para estabelecer os valores de referência de hemoglobinas por HPLC no Brasil, foram analisadas 482 amostras com Hb normais; 136 com Hb S em heterozigose; 106 com Hb S em heterozigose associada à alfa talassemia, 18 com Hb S em homozigose e nove duplos heterozigotos para Hb S e Hb C. Os valores médios de Hb A, Hb A2 e Hb F diferiram em todos os grupos com presença de Hb S quando comparados com o grupo AA. Os valores de Hb A2 foram semelhantes entre os fenótipos com Hb S, mas superiores à faixa de normalidade. Os fenótipos AS e ASH não diferiram quanto às percentagens de Hb A, Hb A2 e Hb F e apenas a quantidade de Hb S foi maior no grupo AS. Na análise qualitativa, utilizando uma ferramenta *Data Mining* de visualização 3D (*FastMap*), foram visualizados quatro grupos distintos, AA e SS localizados em extremos opostos, AS e ASH com sobreposição de valores e distribuição intermediária, e SC entre as heterozigoses e SS. Os valores de Hb estabelecidos poderão ser usados como referência para a população brasileira, alertando para os níveis aumentados de Hb A2 que deverão ser avaliados com precaução para evitar diagnósticos incorretos.

Palavras Chave: valores de referência, hemoglobina S, HPLC, bioinformática

Introdução

A eletroforese em acetato de celulose em pH alcalino é um método amplamente utilizado para o diagnóstico das hemoglobinopatias, uma vez que as análises podem ser efetuadas com rapidez e baixo custo, no entanto, deve ser utilizada como teste de rastreamento inicial para a detecção de hemoglobinas (Hb) variantes. A eletroforese em pH ácido pode auxiliar a confirmação de algumas Hb como Hb A, Hb F, Hb S e Hb C, porém não permite a distinção entre Hb D e Hb G, Hb O e Hb E. Embora esses métodos sejam de fácil reprodutibilidade, não fornecem uma identificação precisa da variante devido a co-migração de formas semelhantes e, metodologias complementares devem ser realizadas para a caracterização dessas hemoglobinas [1,2].

A Cromatografia Líquida de Alta Pressão (HPLC) estabelecida pelo Sistema automatizado VARIANT (Bio-Rad) é um método que permite o diagnóstico de Hb anormais com rapidez e precisão, utilizando uma pequena quantidade de amostra [3,4]. A HPLC de troca iônica permite a quantificação das Hb A₂, Hb F, Hb A, Hb S e Hb C e o rastreamento de Hb variantes, sendo uma importante metodologia para a investigação de hemoglobinopatias em laboratórios de rotina [1,5,6]. A análise da porcentagem da Hb variante e do seu tempo de retenção permitem, em muitos casos, uma identificação mais precisa do mutante do que pelos métodos eletroforéticos [6]. Dessa forma, as informações sobre os valores de referência para as diferentes frações de Hb, obtidas por HPLC, são necessárias para a correta identificação dessas Hb variantes [7].

Fundamentados nessa justificativa e diante da diversidade fenotípica da população brasileira, objetivou-se estabelecer os valores de referência para adultos normais e portadores de Hb S no Brasil, comparando os diferentes fenótipos encontrados com o auxílio da estatística e informática.

Material e Métodos

Foram analisadas 751 amostras de sangue periférico, colhidas com EDTA como anticoagulante, após consentimento informado, de indivíduos com idade acima de um ano, sem distinção de gênero e etnia, provenientes de diferentes estados brasileiros.

As amostras foram analisadas por procedimentos eletroforéticos em pH 8,6, pH 7,0 e pH 6,2 e pela HPLC em Sistema automatizado VARIANT automatizado (Bio-Rad) com o “beta Thalassemia Short Program” para o diagnóstico. Neste sistema, as frações de Hb são separadas baseadas em suas interações iônicas com a coluna catiônica sob alta pressão e por eluição com dois tampões fosfato que diferem em pH e força iônica. O resultado é emitido em forma de um cromatograma com a porcentagem e o tempo de retenção de cada fração de Hb [8].

Aos valores de Hb A0 obtidos pela HPLC foram incluídas as subfrações de Hb A glicosilada e Hb A acetilada, denominadas “P2” e “P3” respectivamente no software do equipamento. Para o grupo controle, os valores de Hb A2 considerados normais foram de 2,0 a 3,5% e os de Hb F até 1,3%, fornecidos pelo fabricante e, previamente comparados por outros sistemas de análise para as condições do laboratório. Os valores de Hb A2 considerados para definição do grupo amostral com Hb S foram de até 5,2% para os grupos heterozigotos e de até 5,9% nos grupos com Hb SS e Hb SC, utilizando os limites estabelecidos por Shokrani e colaboradores [9].

Após as análises eletroforéticas e cromatográficas, os indivíduos foram separados em cinco grupos segundo o fenótipo: com Hb normal (AA); Hb S em heterozigose (AS); Hb S em heterozigose associada à alfa talassemia (ASH); Hb S em homozigose (SS) e duplos heterozigotos para Hb S e Hb C (SC).

A estatística descritiva dos grupos, considerando todos os valores de Hb, foi realizada pela análise canônica multivariada (MANOVA-CVA) a qual produz uma representação das amostras de cada grupo em um gráfico sobre dois eixos. Também foi aplicada uma ferramenta *datamining* de visualização 3D (*FastMap*) para detecção de padrões de comportamento dos diferentes fenótipos [10].

Para comparar os valores de Hb entre os grupos foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis e para comparação da razão entre Hb A e Hb S utilizou-se o teste não paramétrico Mann-Whitney, com nível de significância $p < 0,05$ [11].

Resultados

Foram encontradas 482 amostras com fenótipo AA, 136 AS, 106 ASH, 18 SS e nove SC, sendo que o grupo de indivíduos normais foi usado como controle para o estabelecimento dos valores de normalidade. Todas as amostras com Hb S apresentaram eluição da Hb variante na janela de Hb S, estabelecida pelo aparelho, com tempo de retenção médio de 4,57 ($\pm 0,028$, variando de 4,51 a 4,63).

No grupo AA, a média de Hb A observada foi igual a 96,54% ($\pm 0,64\%$, variando de 95,0 a 98,0); Hb A2 igual a 2,82% ($\pm 0,27\%$, variando de 2,2 a 3,5) e Hb F igual a 0,34% ($\pm 0,31\%$, variando de 0,0 a 1,0), estando todos os valores dentro da faixa esperada.

Para o grupo AS a média de Hb A foi igual a 56,57% ($\pm 2,73\%$, variando de 51,7 a 67,7); Hb A2 igual a 4,30% ($\pm 0,44\%$, variando de 2,9 a 5,2), Hb F igual a 0,50% ($\pm 0,34\%$, variando de 0,0 a 1,3) e Hb S de 38,54% ($\pm 3,01\%$, variando de 27,2 a 43,4).

No grupo ASH, a média de Hb A foi de 58,81% ($\pm 3,75\%$, variando de 52,1 a 68,0); Hb A2 igual a 4,18% ($\pm 0,42\%$, variando de 2,8 a 5,2); Hb F igual a 0,53% ($\pm 0,36\%$, variando de 0,0 a 1,3) e Hb S igual a 36,54% ($\pm 3,76\%$, variando de 26,6 a 43,0).

Nos homozigotos SS a média de Hb A2 foi igual a 3,90% ($\pm 1,14\%$, variando de 0,8 a 5,6); Hb F igual a 15,75% ($\pm 5,27\%$, variando de 7,2 a 23,1) e Hb S igual a 75,13% ($\pm 4,73\%$, variando de 69,3 a 84,8).

Nos duplos heterozigotos SC, a média de Hb A2 foi igual a 4,39% ($\pm 0,59\%$, variando de 3,8 a 5,7); Hb F igual a 1,70% ($\pm 1,72\%$, variando de 0,4 a 5,5%); Hb S igual a 45,65% ($\pm 1,05\%$, variando de 43,8 a 47,1) e Hb C igual a

46,71% ($\pm 1,35\%$, variando de 44,8 a 48,2). Os valores obtidos foram agrupados na Tabela 1 para melhor visualização dos dados.

A avaliação exploratória dos valores referenciais utilizando a análise MANOVA-CVA mostrou quatro grupos distintos, com Hb AA, com Hb S em heterozigose (AS e ASH), com Hb S em homozigose e com Hb S associada à Hb C, estando diametralmente opostos em um plano bidimensional. A Figura 1 ilustra essa distribuição. As homozigoses AA e SS localizaram-se em extremos opostos enquanto que as heterozigoses, AS e ASH, apresentaram distribuição intermediária, entre os dois pontos de homozigotos e com sobreposição de valores, evidenciando uma similaridade entre si. Os parâmetros de análise para este procedimento incluíram as frações de Hb A, Hb A2, Hb F e Hb S. Quando se efetuou a observação desses grupos em sistema *datamining*, a imagem gerada, ilustrada na Figura 2, mostrou-se similar às obtidas por MANOVA-CVA, porém, foi possível visualizar uma disposição intermediária do grupo SC entre os heterozigotos AS e ASH e o grupo SS.

As análises estatísticas demonstraram que todos os grupos com presença de Hb S apresentaram diferença significativa nos valores médios de Hb A, Hb A2 e Hb F ($p < 0,05$) quando comparados com o grupo AA, além da fração correspondente à Hb S, variante determinante do fenótipo.

Entre os grupos AS e ASH não houve diferença estatisticamente significativa na comparação das quantidades de Hb A, Hb A2 e Hb F, justificando assim, a sobreposição dos grupos na análise exploratória. Nessa comparação, apenas a quantidade de Hb S diferiu estatisticamente, sendo maior no grupo AS.

Também foram calculadas as razões entre Hb A e Hb S para traçar o perfil das médias dessas Hb. No grupo AS, a razão média encontrada foi igual a 1,48 ($\pm 0,20$, variando de 1,2 a 2,4) a qual foi semelhante a razão de $1,4 \pm 0,2$ encontrada por Roa et al., 1995, em população afro-americana adulta com Hb S. No grupo ASH a razão igual 1,64 ($\pm 0,30$, variando de 1,2 a 2,6) foi estatisticamente diferentes ($p < 0,01$) da razão do grupo AS.

A análise pelo *FastMap* utilizando apenas os valores de Hb A, apresentada na Figura 3, mostrou três grupos dispostos linearmente, com AA em uma das

extremidades, com valores estatisticamente diferentes dos demais, um grupo intermediário com AS e ASH com disposição paralela e um grupo com SS e SC na extremidade oposta ao grupo AA. Os valores de Hb A entre AS e ASH não apresentaram diferenças estatisticamente significativas.

A análise dos valores de Hb S apresentou disposição semelhante à dos valores de Hb A, no entanto, o grupo SC apresentou-se paralelamente disposto aos grupos AS e ASH, como visualizado na Figura 4. Os valores de Hb S nos grupos AS, ASH e SC diferiram estatisticamente, embora tenham ocupado uma mesma disposição espacial. Desta forma, não foi possível inferir com precisão as similaridades entre os grupos apenas pelo padrão de comportamento dos dados gerados pelo *FastMap*.

A análise dos valores de Hb A2, utilizando o *FastMap* e apresentada na Figura 5A mostrou três grupos, o mais externo AA, AS e ASH com distribuição próxima e intermediária e o grupo com SS e SC com valores distantes dos demais. No entanto, com a rotação da imagem, visualizada na Figura 5B, os grupos com Hb S apresentaram-se dispostos paralelamente e AA continuou como um grupo externo ao plano central. Foi verificado que, nos grupos com Hb S, não houve diferença estatisticamente significativa entre os valores de Hb A2, os quais foram superiores aos esperados para a faixa de normalidade e diferentes do grupo utilizado como controle, justificando a disposição espacial dos grupos.

Para os valores de Hb F, ilustrados na Figura 6, foram observados os grupos AA, AS, ASH e SC dispostos paralelamente e o SS em disposição mais externa no plano, devido principalmente, aos valores de Hb F mais elevados. Os valores de Hb F de todos os grupos com Hb S apresentaram diferença estatisticamente significativa quando comparados aos do grupo AA, e com valores médios maiores que a média normal. Os valores do grupo SS foram maiores que todos os outros grupos e os dos grupos AS, ASH e SC não diferiram entre si.

Discussão

Os métodos eletroforéticos de rotina foram utilizados para o rastreamento das Hb normais e variantes, e a HPLC permitiu a confirmação das Hb observadas pelos métodos anteriores e a quantificação das frações de forma precisa. Assim como observado por Fisher e colaboradores [5], neste trabalho houve concordância entre os achados eletroforéticos e cromatográficos nas amostras avaliadas.

Joutovsky e colaboradores 2004 demonstraram que a HPLC é uma importante ferramenta de análise para identificação das Hb variantes, principalmente, se utilizada a informação do seu tempo de retenção [6]. Neste trabalho, foi possível verificar que os valores percentuais médios das Hb obtidos pela HPLC também são de grande utilidade, em especial para identificação das Hb variantes e da associação entre diferentes hemoglobinopatias, comparando-os com valores de normalidade, permitindo inferir fenótipos.

As análises exploratórias realizadas no grupo amostral com todos os valores de Hb mostraram sobreposição espacial dos grupos AS e ASH, pois apresentaram diferenças apenas na quantidade de Hb S. Também foi verificado que o grupo considerado heterozigoto, AS e ASH, apresentou uma distribuição intermediária entre o grupo AA e o SS, uma vez que apresentam tanto a Hb normal quanto a Hb variante. Na análise utilizando o *FastMap*, pôde-se observar que o duplo heterozigoto também apresentou distribuição intermediária, porém entre os grupos AS/ASH e o grupo SS, uma vez que apresenta a Hb S em heterozigose, associada à Hb C, destacando as interfaces da herança entre os genótipos e expressão fenotípica.

Pelas análises dos valores de Hb, de forma separada, utilizando o *FastMap*, foi possível obter uma visão espacial dos valores de Hb em 3D, corroborando os achados para homozigotos normais e anormais, heterozigotos e duplo heterozigotos. No entanto, as análises estatísticas foram fundamentais para testar essas diferenças, mostrando que apenas pela análise exploratória não foi possível inferir com precisão, as diferenças existentes entre os grupos analisados.

Os valores de referência de Hb A, Hb A2 e Hb F observados para o grupo AA podem ser usados como parâmetro em casos de suspeita da presença de uma Hb anormal, quando as porcentagens obtidas não forem compatíveis, corroborando com os achados de Roa e colaboradores para a população afro-americana [7].

No grupo ASH a quantidade de Hb S foi menor que no grupo AS, com diferença estatisticamente significativa. Essa diminuição deve-se à associação com a alfa talassemia a qual decorre da deficiência na síntese de cadeia alfa, que acarretará decréscimo na formação de tetrâmeros de Hb S [9,12]. Essa diferença foi confirmada, no grupo avaliado, pelo cálculo das razões entre Hb A e Hb S, no qual foi possível verificar uma razão maior no grupo ASH quando comparado à razão do grupo AS. Valores semelhantes foram observados por Roa e colaboradores em uma população afro-americana adulta e com Hb S [7]. A alteração destas razões pode ser um indicativo de associação com uma outra hemoglobinopatia [7]. Desta forma, foi possível diferenciar os grupos AS e ASH pela comparação dos valores percentuais médios de Hb S e das razões entre Hb A e Hb S.

Foi verificado também, que os grupos com Hb S mostraram valores de Hb A2 acima da normalidade, os quais devem ser considerados com precaução. Shokrani e colaboradores propuseram que nessas situações, a associação entre a cadeia alfa e a cadeia beta variante é prejudicada, o que promove a associação da cadeia alfa à cadeia delta, aumentando os níveis de Hb A2, além da coeluição da Hb S glicosilada e outras subfrações na janela da Hb A2 [9]. Em estudos mais recentes utilizando técnicas de espectrometria de massa foi proposto que o aumento dos valores de Hb A2 em portadores de Hb S, deve-se à coeluição de um componente menor de Hb formado por uma cadeia alfa modificada pós-traducionalmente por carboamilação associada à cadeia beta S [13].

Portanto, Shokrani e colaboradores, avaliando os valores de Hb A2 em amostras contendo Hb S, propuseram que valores até 5,2% em heterozigotos e até 5,9% em indivíduos com Hb SS e Hb SC podem ser considerados normais desde que não haja outro sinal de beta talassemia. Esses valores foram utilizados aqui

para definir os valores de corte dos grupos amostrais. Para a população brasileira pode-se considerar como normal os valores de Hb A2 de 2,9 a 5,2% para Hb AS; 2,8 a 5,2% para Hb ASH; 0,8 a 5,6% para Hb SS e 3,8 a 5,7% para Hb SC, sendo esta a referência de diagnóstico por HPLC no Sistema VARIANT.

Os valores de Hb F nos portadores de Hb S em heterozigose, embora estivessem dentro da faixa de normalidade foram estatisticamente maiores que os do grupo controle, devido à presença da Hb variante e de seus possíveis haplótipos. No grupo SS, todas as amostras apresentaram valores acima da normalidade que podem ser resultantes do uso de medicamentos, Persistência Hereditária de Hb F ou característica do haplótipo. No grupo SC não foram considerados os valores de Hb F para a avaliação global, devido à pouca quantidade de amostras o que prejudicaria esta análise.

Conclusão

Neste trabalho, foi possível estabelecer os valores de Hb que poderão ser usados como referência em estudos populacionais, por HPLC, e identificar as diferenças nos valores de Hb entre portadores de Hb S, para a população brasileira. Valores de Hb A menores que os do grupo normal, Hb A2 e Hb F aumentados, e a presença de fração variante eluída na janela de Hb S são características fenotípicas sugestivas da Hb S. Essas variações nos valores de Hb devem ser observadas isoladamente para sugerir as possíveis associações com outras hemoglobinopatias. Os níveis aumentados de Hb A2 também devem ser avaliados com precaução para evitar diagnósticos incorretos e para confirmar as suspeitas de Hb S, tendo em vista a ausência desses adutos em outras hemoglobinopatias.

Referências

1. Clarke GM, Higgins TN. Laboratory Investigation of Hemoglobinopathies and Thalassemias: Review and Update. Clin Chem 2000;46:1284-1290.
2. Zamaro PJA, Canalli AA, Silva Jr WA, Bonini-Domingos CR. Diagnóstico laboratorial de hemoglobinas semelhantes à Hb S. J Bras Patol 2002;38:261-266.
3. Old JM. Screening and genetic diagnosis of haemoglobin disorders. Blood Rev 2003;17:43-53.
4. Ou C, Rognerud CL. Diagnosis de hemoglobinopathies: eletrophoresis vs. HPLC. Clin Chim Acta 2001;313:187-194.
5. Fisher SI, Haga JA, Castleberry SM, Hall RB, Thompson WC. Validation of an Automated HPLC Method for Quantification of Hemoglobin S. Clin Chem 1997;43:1667-1669.
6. Joutovsky A, Hadzi-Nesic J, Nardi MA. HPLC Retention Time as a Diagnostic Tool for Hemoglobin Variants and Hemoglobinopathies: A Study of 60 000 Samples in a Clinical Diagnostic Laboratory. Clin Chem 2004;50:1736-1747.
7. Roa D, Turner EA, Aguinaga MDP. Reference Ranges for Hemoglobin Variants by HPLC in African Americans. Ann Clin Lab Sci 1995;25:228-235.
8. Instruction Manual of BIO-RAD, Variante beta-Thalassemia Short Program Instruction Manual. BioRad Laboratories, 1999.

9. Shokrani M, Turner FTEA, Aguinaga MDP. Chromatographic Measurements of Hemoglobin A2 in Blood Samples that Contain Sick Hemoglobin. *Ann Clin Lab Sci* 2000;30:191-194.
10. Tronco MN, Valêncio CR. Implementação de Recursos de Visualização e Interação em Ferramenta *Data Mining*. São José do Rio Preto. Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista 2003.
11. Zar JH. *Biostatistical Analysis*. 4.ed. New Jersey: Prentice Hall, 1999.
12. Serjeant GR. Sick cell disease. *Lancet* 1997;350:725-730.
13. Zurbriggen K, Schmugge M, Schmid M, Durka S, Kleinert P, Kuster T, Heizmann CW, Troxler H. Analysis of Minor Hemoglobins by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Fight Mass Spectrometry. *Clin Chem* 2005;51:989-996.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Paulo Henrique Mangonaro pela confecção das imagens de visualização 3D (*FastMap*) e ao Fabrício Barreto Teresa pelo auxílio nas análises estatísticas.

Tabela 1: Valores percentuais médios das frações de Hb, obtidos por HPLC, no grupo controle e grupos com Hb S.

Fenótipos	Média $\pm$ Desvio padrão (%)				
	Mínimo-Máximo (%)				
	AA	AS	ASH	SS	SC
Hb A	96,47 $\pm 0,77$ 93,8-98,2	56,57 $\pm 2,73$ 51,7-67,7-	58,81 $\pm 3,75$ 52,1-68,0	– –	– –
Hb A2	2,81 $\pm$ 0,31 2,0-3,5	4,30 $\pm$ 0,44 2,9-5,2	4,18 $\pm$ 0,42 2,8-5,2	3,90 $\pm$ 1,14 0,8-5,6	4,39 $\pm$ 0,35 3,8-5,7
Hb F	0,37 $\pm$ 0,35 0,0-1,3	0,50 $\pm$ 0,34 0,0-1,3	0,53 $\pm$ 0,36 0,0-1,3	15,75 $\pm 5,27$ 7,2-23,1	1,70 $\pm$ 1,72 0,4-5,5
Hb S	– –	38,54 $\pm 3,01$ 27,2-43,4	36,54 $\pm 3,76$ 26,6-43,0	75,13 $\pm 4,73$ 69,3-84,8	45,65 $\pm 1,05$ 43,8-47,1

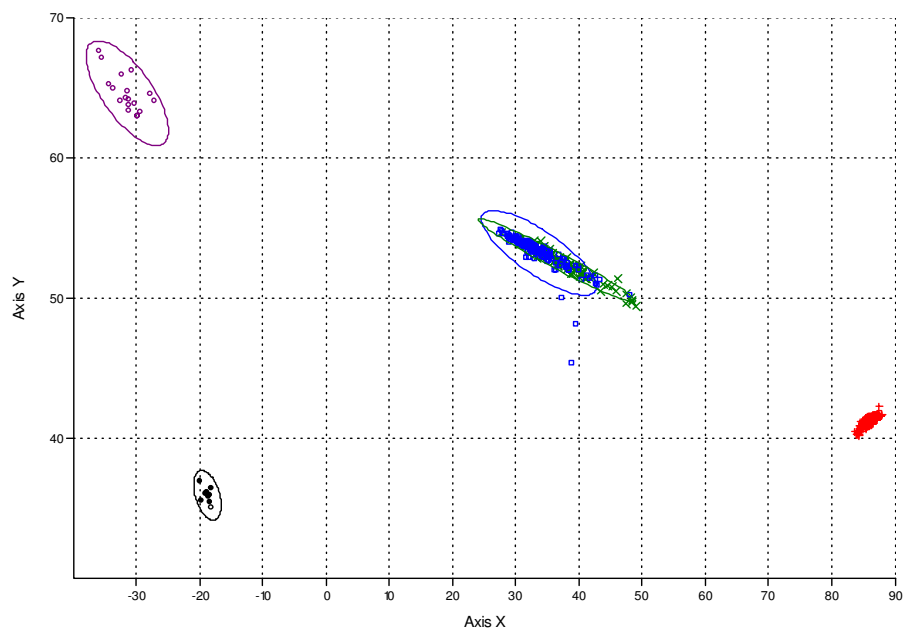


Figura 1: Representação da análise multivariada canônica dos grupos AA (vermelho), AS (azul), ASH (verde), SS (roxo) e SC (preto) considerando valores de HbA, HbA2, HbF e HbS no espaço das variáveis canônicas.

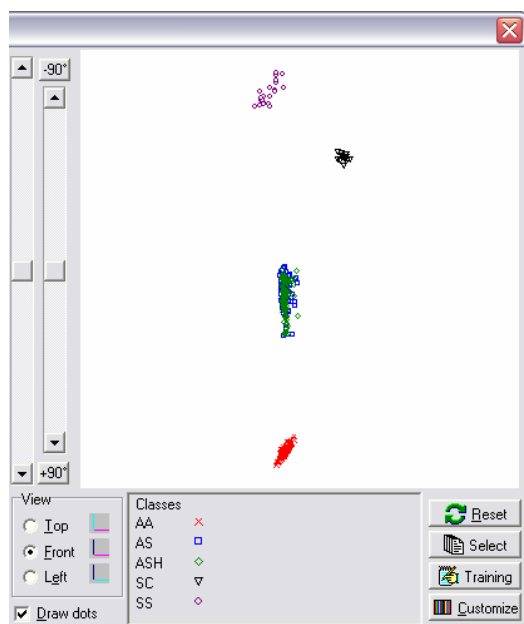


Figura 2: Imagem obtida pelo *FastMap* para os grupos AA (vermelho), AS (azul), ASH (verde), SS (roxo) e SC (preto), incluindo todos os valores percentuais de Hb.

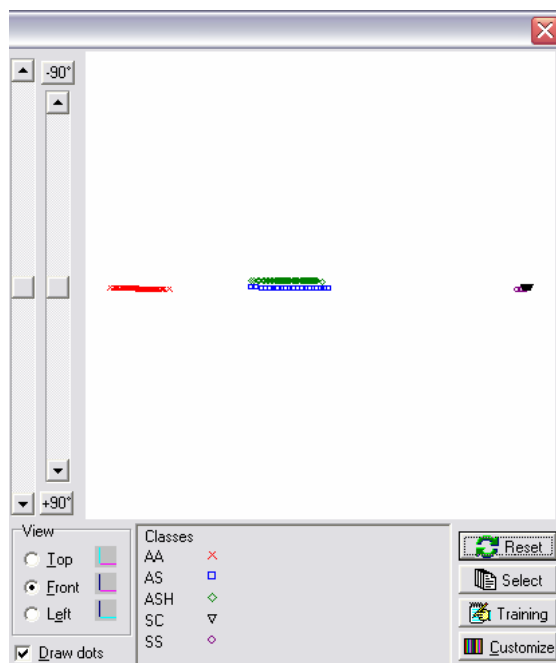


Figura 3: Imagem obtida pelo *FastMap* para os grupos AA (vermelho), AS (azul), ASH (verde), SS (roxo) e SC (preto), incluindo os valores percentuais de Hb A.

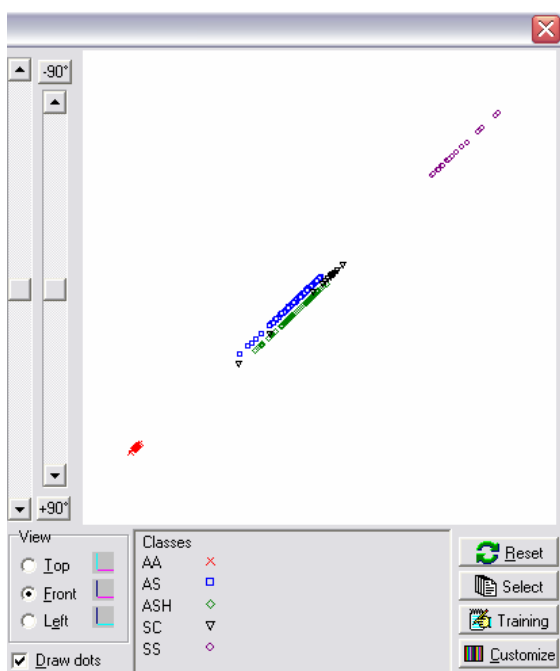


Figura 4: Imagem obtida pelo *FastMap* para os grupos AS (azul), ASH (verde), SS (preto) e SC (roxo), incluindo os valores percentuais de Hb S.

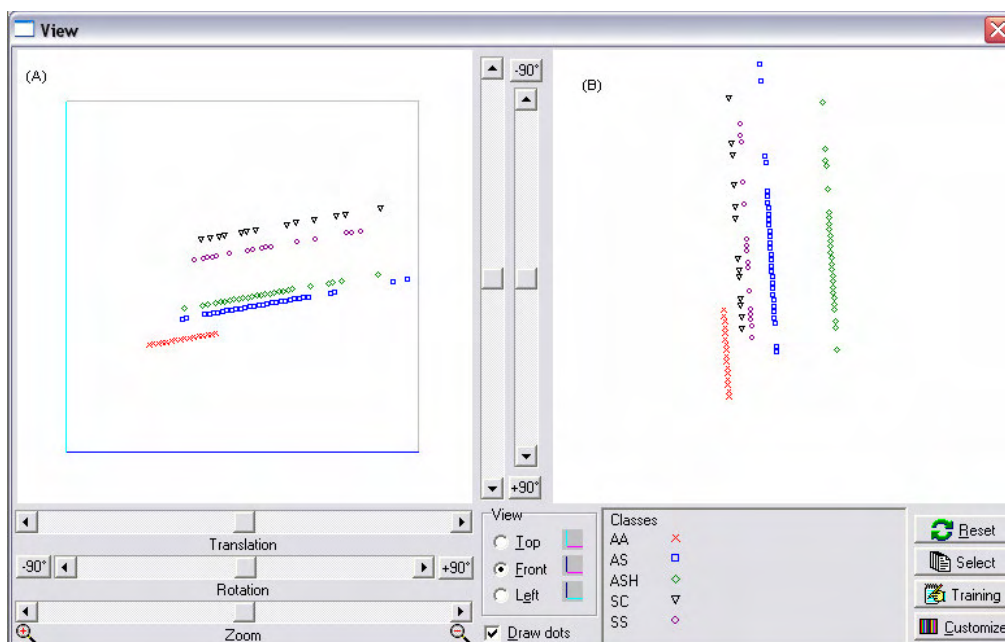


Figura 5: (A) Imagem, dos valores de Hb A2, inicialmente obtida pelo *FastMap* para os grupos AA (vermelho), AS (azul), ASH (verde), SS (roxo) e SC (preto), incluindo os valores percentuais de Hb A2; (B) Imagem com rotação.

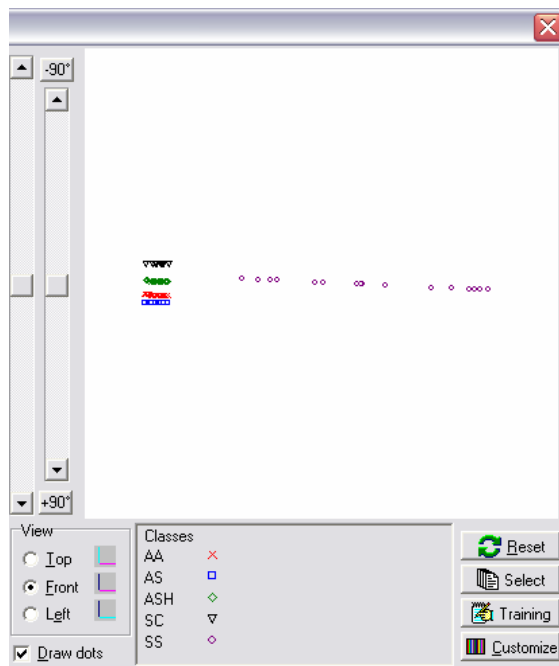


Figura 6: Imagem obtida pelo *FastMap* para os grupos AA (vermelho), AS (azul), ASH (verde), SS (rox)

Este trabalho foi publicado na Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia
na seção de carta ao editor.

ISSN: 1516-8484

Carta ao Editor / Letter to Editor

A importância do diagnóstico laboratorial clássico na identificação de variantes de hemoglobinas***The importance of classical laboratorial diagnosis in the identification of variant hemoglobins***

Luciana S. Onde¹
Paula J. A. Zamaro¹
Claudia R. Bonini-Domingos¹

¹Unesp – Universidade Estadual Paulista – Ibilce.

Trabalho realizado no Laboratório de Hemoglobinas e Genética das Doenças Hematológicas (LHGDH) da Unesp – Campus de São José do Rio Preto, SP.

Sr. Editor,

As hemoglobinopatias podem ser resultantes de mutações que afetam os genes reguladores promovendo um desequilíbrio no conteúdo quantitativo das cadeias polipeptídicas e consequentemente nos tipos normais de Hb, causando as talassemias, ou, ainda, de alterações envolvendo genes estruturais que promovem a formação de moléculas de Hb com características bioquímicas diferentes das Hb normais, também denominadas Hb variantes.¹

Mais de 800 variantes de Hb já foram descritas até o momento.² A maioria delas é originada por simples substituições de aminoácidos, resultantes de mudanças nas seqüências de nucleotídeos.¹

Atualmente, o número de Hb anormais identificadas tem aumentado devido à melhoria nas metodologias de análises; no entanto, muitos laboratórios de rotina não estão preparados para a correta identificação das Hb variantes. Deste modo, objetivou-se caracterizar os mutantes de Hb das amostras de sangue enviadas ao Laboratório de Hemoglobinas e Genética das Doenças Hematológicas (LHGDH), utilizando-se diversas metodologias de análises para evidenciar sua aplicabilidade.

Foram analisadas 83 amostras de sangue periférico coaguladas com EDTA, após consentimento informado, provenientes de diferentes estados brasileiros e da Colômbia, sem distinção de sexo, idade, etnia ou classe social.

As amostras foram avaliadas pelos testes para identificação de hemoglobinopatias que consistiram da análise da

morfologia eritrocitária; resistência globular osmótica em NaCl a 0,36 %; eletroforese em pH alcalino em acetato de celulose; eletroforese em gel de ágar, pH ácido e cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) em Sistema Variant automatizado da Bio-Rad com kit de análise para beta talassemia heterozigota.^{1,3,4,5,6} Para a identificação das cadeias globínicas mutantes foram realizadas as metodologias de eletroforese de cadeias em pH alcalino em acetato de celulose e eletroforese de cadeias globínicas em pH ácido em gel de poliacrilamida 12%.^{7,8}

Após a realização dos procedimentos clássicos para o diagnóstico de hemoglobinopatias, verificou-se a presença de Hb com padrões de migração diversos, sendo que 37 (45%) delas migraram em posição semelhante à Hb S em pH alcalino. Após a combinação dos resultados obtidos nas metodologias clássicas citadas, as Hb variantes foram submetidas a análises para definição da cadeia globínica alterada.

Foram realizadas as eletroforeses de cadeias globínicas em pH ácido e pH alcalino. Em pH ácido, a maioria dos mutantes não apresentou separação das globinas normais ($\alpha^2\beta^2$), sendo possível reconhecer a fração mutante de Hb C, utilizada como padrão para esses procedimentos eletroforéticos, Hb E Saskatoon, Hb J Oxford e Hb Hasharon, sendo as duas primeiras mutantes de globina beta e as outras, mutantes de globina alfa. Também foram detectadas as cadeias gama alanina e gama glicina nas amostras que apresentaram Hb F aumentada. Em pH alcalino, foi possível identificar a cadeia globínica alterada em 68 (82%) amostras. Foram encontrados 35 (42%) mutantes de cadeia beta, 24 (29%) de cadeia alfa, quatro (5%) de cadeia delta, três (4%) de cadeia gama e duas (2%) fusões de cadeia delta/beta. Não foi possível identificar a cadeia globínica alterada em 15 (18%) amostras.

Dos mutantes de cadeia beta, 20 (57%) migraram em posição semelhante à Hb S em eletroforese em pH alcalino; em pH ácido todas essas amostras apresentaram padrão de migração normal e o perfil cromatográfico foi diferente do padrão para Hb S. As suspeitas fenotípicas para esse grupo foram de Hb D Los Angeles, Hb D Iran e Hb Korle Bu. Nove amostras (26%) migraram na posição de Hb C na eletroforese em pH alcalino. No entanto, os perfis eletroforético em pH ácido e cromatográfico, não foram compatíveis com os de Hb C. Os dados obtidos sugeriram os fenótipos de Hb E e Hb E Saskatoon. Também foram observados seis casos (17%) de Hb rápidas que migraram acima de Hb A em pH alcalino em que as suspeitas fenotípicas foram de Hb J Baltimore, Hb J e Hb Deer Lodge. Em dois casos (6%) não foi possível encontrar uma provável suspeita fenotípica com o conjunto de informações laboratoriais obtido. As frequências absolutas dos fenótipos encontrados estão representadas na Figura 1.

Entre os mutantes de cadeia alfa, 14 (58 %) migraram na posição de Hb S em eletroforese em pH alcalino. As suspeitas fenotípicas foram de Hb Queen, Hb Hasharon, Hb G e Hb Q Índia. Em pH ácido, a Hb Queen apresentou uma fração difusa abaixo da Hb A; a Hb Hasharon, uma fração difusa em posição semelhante à Hb S; a Hb G, uma banda na posição da Hb S e a Hb Q Índia uma fração entre Hb A e Hb S. Também

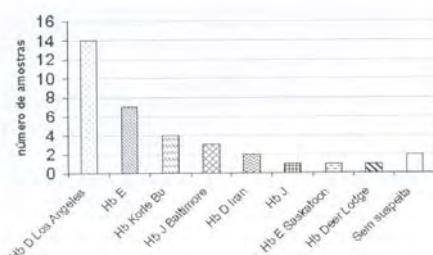


Figura 1. Suspeitas fenotípicas de Hb mutantes de cadeia beta, identificadas pelos métodos clássicos e análise de globina, com suas frequências absolutas

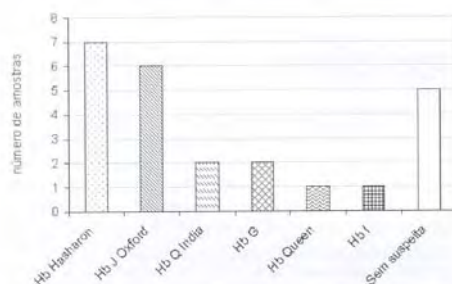


Figura 2. Suspeitas fenotípicas de Hb mutantes de cadeia alfa, identificadas pelos métodos clássicos e análise de globina, com suas frequências absolutas

foram encontrados 10 casos (42 %) de Hb rápidas que migram acima de Hb A em eletroforese em pH alcalino, nas quais as suspeitas foram de Hb I e Hb J Oxford. Das 24 amostras mutantes de cadeia alfa, não foi possível identificar uma suspeita fenotípica em cinco (21 %) delas. As frequências absolutas encontradas para esses fenótipos estão representadas na Figura 2.

Também foram encontradas suspeitas de mutantes de cadeia delta, cadeia gama e casos com fusão de cadeias delta/beta. Das quatro suspeitas de cadeia delta, três casos foram de Hb B2; para os mutantes de cadeia gama não foi possível identificar corretamente as variantes, e as fusões de cadeias delta/beta sugeriram Hb Lepore que também apresentam migração na posição de Hb S.

O método amplamente utilizado para o diagnóstico das hemoglobinopatias é a eletroforese em acetato de celulose, pH alcalino, uma vez que as análises podem ser efetuadas com rapidez e baixo custo.⁹ No entanto, não permite a distinção de Hb com co-migração, como as que migram em posição semelhante à Hb S.¹⁰ A eletroforese em pH ácido pode auxiliar

na confirmação de algumas Hb como Hb A, Hb F, Hb C e Hb D, porém não permite a distinção entre as Hb S, Hb G, Hb Hasharon e Hb Q Índia, que migram em posições semelhantes.¹¹ Portanto, são indicadas como testes de rastreamento inicial para a detecção de Hb variantes, e metodologias complementares devem ser realizadas para a caracterização das Hb com migração semelhante.¹⁰

Nesse trabalho verificou-se que as variantes não puderam ser identificadas apenas pelos métodos eletroforéticos usuais. As 37 (45 %) Hb variantes que migraram na posição de Hb S em pH alcalino não foram confirmadas em pH ácido e não se chegou a uma suspeita fenotípica. Os demais perfis eletroforéticos também não puderam ser identificados apenas com a aplicação dessas duas metodologias. Portanto, evidenciou-se a dificuldade de interpretação das Hb variantes, principalmente daquelas que migraram em posição semelhante à Hb S em pH alcalino que poderiam ter sido identificadas incorretamente apenas com a aplicação dessas metodologias.

A HPLC com sistema automatizado Variant Bio-Rad é um método rápido, preciso e com boa reprodutibilidade.¹² Para os resultados encontrados neste trabalho, a associação das análises cromatográficas aos resultados eletroforéticos foram fundamentais no levantamento das prováveis Hb variantes.

A eletroforese de cadeias globínicas é uma metodologia de separação das globinas bastante precisa, podendo ser utilizada para a identificação das cadeias mutantes como uma análise pré-molecular permitindo a visualização das cadeias beta, delta, alfa normais e mutantes.¹⁰ Em pH ácido, permitiu a visualização das cadeias gama glicina e gama alanina nas amostras que apresentaram Hb F aumentada e as frações mutantes das Hb E-Saskatoon e Hb J Oxford. A técnica analítica em pH alcalino apresentou boa resolução para os mutantes de cadeias alfa, beta e fusão delta/beta, permitindo a identificação da cadeia globínica mutante na maioria das Hb variantes.

Os resultados globais mostraram que as Hb variantes não puderam ser identificadas apenas pelos métodos eletroforéticos usuais os quais são utilizados, pela maioria dos laboratórios, como únicas metodologias de análise. A dificuldade na identificação das Hb variantes ficou evidenciada para aquelas que apresentaram perfil semelhante à Hb S em pH alcalino, podendo ser diagnosticadas incorretamente. Portanto, para a identificação das Hb variantes e um diagnóstico seguro é fundamental a associação dos métodos eletroforéticos clássicos com análises cromatográficas e as eletroforeses de cadeias globínicas que constituem uma análise pré-molecular.

Abstract

Variant hemoglobins originate principally from simple amino acid substitutions, resulting in nucleotides sequence changes. Currently, the number of abnormal hemoglobins identified has increased due to the improvement in the analytic methodologies; however, many routine laboratories are not prepared for correct mutant

identification. Thus, we aimed at characterizing the variant hemoglobins in blood samples sent to our laboratory using several analytic methodologies. Eighty-three samples of peripheral blood collected in EDTA were analyzed by cytological, biochemical, electrophoretic and chromatographic methods. The results of the electrophoretic procedures in alkaline pH indicated several migration patterns, with 45 % of the samples in the hemoglobin S position. The differentiation of this hemoglobin was only possible with the association of electrophoretic and chromatographic methods. The profiles of the mutants observed in globin chain electrophoresis were 42% of beta chain mutants, 29% of alpha chain, 5% of delta chain, 4% of gamma chain and 2% of delta/beta chains fusion. The global results showed that the variants could not have been identified by the usual electrophoretic methods alone evidencing the difficulty in identification, specifically in cases with profiles similar to hemoglobin S in alkaline conditions, which can be incorrectly diagnosed. Therefore, for the identification of variant hemoglobins and a diagnostic reliability the association of electrophoretic, chromatography and globin chain analyses as a pre-molecular procedure is fundamental.

Key words: Hemoglobin variants; globin chains; hemoglobin polymorphism; diagnosis.

Referências Bibliográficas

1. Bonini-Domingos CR. Hemoglobinopatias no Brasil: variabilidade genética e metodologia laboratorial. Tese de Doutorado, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista. São José do Rio Preto, 1993, 232 p.
2. Huisman HJ et al. HbVar: A Database of Human Hemoglobin Variants and Thalassemias. Summaries of mutation categories. Pennsylvania University USA and McMaster University in Canada, 1996. Disponível em: <<http://globin.cse.psu.edu/>>. Acesso em 16 fev. 2004.
3. Silvestroni E, Bianco I. Screening for microcytemia in Italy: analyses of data collected in the past 30 years. Am J Hum Genet 1975; 27:198-212.
4. Marengo-Rowe AJ. Rapid electrophoresis and quantification of haemoglobin on cellulose acetate. J Clin Pathol 1965;18:90-192.
5. Vella F. Acid agar gel electrophoresis of human hemoglobins. Am J Clin Pathol 1968;49:440-442.
6. Instrucion Manual Variant β -thalassemia Short Program, 1994.
7. Schneider RG et al. Differentiation of electrophoretically hemoglobins - suchas S, D, G and P or A2, C, E, and O- by electrophoresis of the globin chains. Clin Chem 1974;20:1.111-1.115.
8. Alter BP et al. Globin chain electrophoresis: a new approach to the determination of the G γ /A γ ratio in fetal haemoglobin and to studies of globin synthesis. Br J Haematol 1980;44:527-532.
9. Coelho EAF, Carvalho MG. Aspectos morfológicos das hemoglobinopatias. RBAC 1999;31:201-203.
10. Zamaro PJA et al. Diagnóstico laboratorial de hemoglobinas semelhantes à Hb S. J Bras Patol 2002;38:261-266.
11. Torké NS et al. Acid hemoglobin electrophoresis and glyco-hemoglobin bands. Clin Chem 1991;37:582-583.
12. Ou C, Rognerud CL. Diagnosis de hemoglobinopathies: electrophoresis vs. HPLC. Clin Chem Acta 2001;313:187-194.

Avaliação: Editor Associado e dois revisores externos.
Conflito de interesse: não declarado

Recebido: 20/11/2004
Aceito após modificações:15/12/2004

Correspondência para: Luciana de Souza Ondeí
LHGDH, Departamento de Biologia, Unesp-Ibilce
Rua Cristóvão Colombo, 2265, Jardim Nazareth
15054-000 - São José do Rio Preto-SP
Fone: (17)221-2392. Fax: (17)221-2390
E-mail: luondei@yahoo.com.br

ONDEI, L. S. **Perfil eletroforético e cromatográfico das hemoglobinas “S-like”**. São José do Rio Preto, 2005. 154 f. Dissertação (Mestrado em Genética) - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista.

As hemoglobinas (Hb) variantes, originadas em sua maioria por simples substituições de aminoácidos, resultam de mudanças na seqüência de nucleotídeos. Atualmente, o número de Hb anormais identificadas tem aumentado devido à melhoria nas metodologias de análises, porém muitos laboratórios de rotina não estão preparados para a correta identificação dos mutantes. A Hb S é uma variante de Hb bem caracterizada que apresenta prevalência variável nas diferentes regiões do Brasil. No entanto, há uma variedade de Hb que apresenta padrão de migração eletroforética semelhante ao da Hb S em pH alcalino as quais são denominadas “Hb S-like”, podendo ser erroneamente diagnosticadas e com suas freqüências subestimadas. Neste trabalho foram estabelecidos os valores referenciais de Hb por HPLC em portadores de Hb S e determinados os perfis eletroforético e cromatográfico das Hb “S-like” dentre as amostras enviadas ao LHGDH. Foram encontradas as Hb Hasharon, Hb D-Los Angeles, Hb Korle-Bu, Hb Lepore, Hb D-Iran, Hb tipo G, Hb Queens, Hb Montgomery e Hb Q-Índia. Também foram encontrados casos de associação entre dois mutantes de cadeia beta. As eletroforeses em pH alcalino e pH ácido foram utilizadas para o rastreamento inicial das Hb variantes e as eletroforeses de cadeias polipeptídicas em ambos pH foram realizadas para a identificação da cadeia globínica alterada. As análises cromatográficas permitiram o direcionamento dos prováveis mutantes, sendo também possível a quantificação precisa das frações de variantes. Desta forma, a associação de metodologias laboratoriais clássicas de diagnóstico é fundamental para o levantamento das suspeitas fenotípicas. Os perfis da Hb S e das Hb “S-like” estabelecidos neste estudo auxiliarão no diagnóstico dessas Hb variantes em serviços de saúde.

Palavras-chave: hemoglobinas variantes; diagnóstico laboratorial; eletroforeses; HPLC

ONDEI, L. S. **Electrophoretic and cromatographic profile for “S-like” hemoglobin.** São José do Rio Preto, 2005. 154 f. Dissertação (Mestrado em Genética) - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista.

The variants hemoglobin (Hb) originated mainly by simple amino acid substitutions, result of nucleotides sequences changes. Currently, the number of abnormal hemoglobin identified has increased due to improvement in the analysis methodologies, but many routine laboratories are not prepared for the correct mutants identification. The Hb S is a variant Hb well characterized that shows variable prevalence in different regions of Brazil. However, there is a diversity of Hb that present electrophoretic migration on alkaline pH similar to Hb S, named Hb S-like, which can be incorrectly diagnosed and with their frequencies underestimated. At the present study the reference ranges for Hb S obtained by HPLC were established, and the electrophoretic and cromatographic profile for Hb S like were determined. The Hb Hasharon, Hb D-Los Angeles, Hb Korle-Bu, Hb Lepore, Hb D-Iran, Hb tipo G, Hb Queens, Hb Montgomery e Hb Q-Índia were found. Cases of association between two mutants of beta chain were also found. The electrophoresis on alkaline pH and acid pH were utilized to the initial screen of these variants Hb and the globin chains electrophoresis in both pH were performed to identify the mutant globin chain. The chromatographic analysis permitted the identification of the likely variant hemoglobin and also facilitated the exact quantification of variants. Therefore, the association of the classical laboratory methods of diagnostic is fundamental for the identification of variant Hb suspect. The Hb S and Hb S-like profile determined in this study will help in the diagnostic of these variants Hb in healthy service.

Keywords: hemoglobin variants, laboratory diagnosis, electrophoresis, HPLC

Autorizo a reprodução deste trabalho.

São José do Rio Preto, ____/____/____

Luciana de Souza Ondeí