

**ANA REGINA CHINELATO-FERNANDES**

**DIFERENCIAÇÃO MOLECULAR DE MUTANTES DE  
HEMOGLOBINAS HUMANAS NA POPULAÇÃO  
BRASILEIRA**

Tese apresentada para  
obtenção do Título de  
Doutor em Genética.

---

São José do Rio Preto - SP

2003

**ANA REGINA CHINELATO-FERNANDES**

**DIFERENCIAÇÃO MOLECULAR DE MUTANTES DE  
HEMOGLOBINAS HUMANAS NA POPULAÇÃO  
BRASILEIRA**

**Orientadora: Dra Claudia Regina Bonini-Domingos**

Tese apresentada para  
obtenção do Título de  
Doutor em Genética.

---

São José do Rio Preto - SP

2003

O programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Área de concentração em Genética, passou a denominar-se Programa de Pós-Graduação em Genética pela Resolução UNESP nº RU. 10/01 de 08/03/2001, DOE de 09/03/2001.

Chinelato-Fernandes, Ana Regina.

Diferenciação molecular de mutantes de hemoglobinas humanas na população brasileira / Ana Regina Chinelato-Fernandes – São José do Rio Preto : [s.n.], 2003  
240 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Claudia Regina Bonini-Domingos  
Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista. Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Hemoglobinopatia. 2. Diagnóstico de laboratório. 3. Hemoglobina variante. I. Bonini-Domingos, Claudia Regina. II. Universidade Estadual Paulista. Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 616.155

**ANA REGINA CHINELATO FERNANDES**

**DIFERENCIAÇÃO MOLECULAR DE MUTANTES DE  
HEMOGLOBINAS HUMANAS NA POPULAÇÃO BRASILEIRA**

**BANCA EXAMINADORA**

Orientador \_\_\_\_\_  
Dra. Claudia Regina Bonini-Domingos

1º Examinador \_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Paulo César Naoum

2º Examinador \_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Carlos Roberto Ceron

3º Examinador \_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Luiz Carlos de Mattos

4º Examinador \_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Wilson Araújo da Silva Júnior

**São José do Rio Preto, 27 de fevereiro de 2003**

*Ao meu querido Pai, eterno amigo,  
Que me protege de onde está.*

Dos nossos planos é que tenho mais saudade,  
Quando olhávamos juntos na mesma direção.

Aonde está você agora  
Além de aqui dentro de mim?

Agimos certo sem querer  
Foi só o tempo que errou

Vai ser difícil sem você

Porque você está comigo o tempo todo.

Quando vejo o mar

Existe algo que diz:

- A vida continua e se entregar é uma bobagem.

Já que você não está aqui,

O que posso fazer é cuidar de mim.

Quero ser feliz ao menos.

Lembra que o plano era ficarmos bem?

*Legião Urbana*

*Tocando em frente*

Ando devagar  
Porque já tive pressa  
E levo esse sorriso  
Porque já chorei demais  
Hoje me sinto mais forte  
Mais feliz quem sabe  
Só levo a certeza  
De que muito pouco eu sei, ou nada sei  
Conhecer as manhas e as manhãs  
O sabor das massas e das maçãs  
É preciso amor para poder pulsar  
É preciso paz para poder sorrir  
É preciso a chuva para florir  
Penso que cumprir a vida  
Seja simplesmente  
Compreender a marcha  
Ir tocando em frente  
Como um velho boiadeiro  
Levando a boiada  
Eu vou tocando os dias  
Pela longa estada, eu vou  
Estrada eu sou  
Todo mundo ama um dia  
Todo mundo chora  
Um dia a gente chega  
No outro vai embora  
Cada um de nós  
Compõe a sua história  
Cada ser em si  
Carrega o dom de ser capaz  
E ser feliz.

*Renato Teixeira e Almir Sater*

### Agradecimentos

Este estudo é o resultado de um trabalho no qual a participação de diversas pessoas foi essencial para a sua realização. Desejo aqui expressar minha gratidão.

À Profa. *Dra. Claudia Regina Bonini Domingos*, que recebeu-me em seu grupo. Agradeço pela dedicação, disponibilidade e estímulo essenciais para o desenvolvimento desta pesquisa.

Aos pacientes que permitiram a utilização de seu sangue para esse estudo.

Aos Professores *Dr. Paulo César Naoum, Dr. Carlos Roberto Ceron, Dr. Luiz Carlos de Mattos, Dr. Wilson Araújo da Silva Júnior* pelo cuidado na análise da pró-forma e pelas valiosas sugestões.

Agradeço em especial ao Prof. *Dr. Carlos Roberto Ceron*, pelo exemplo de postura acadêmica. Seus ensinamentos foram muito importantes ao longo do curso de pós-graduação.

À Profa. *Claudia Augusta Hidalgo*, pela análise estatística dos dados obtidos nesse estudo.

Ao *Carlos Fabián Mendiburu* pelo auxílio na confecção dos *primers* para Hb Hasharon.

Pela gentileza e profissionalismo com que contribuíram para este trabalho:

- Às enfermeiras *Kikuê Kamoe de Oliveira* e *Maria Aparecida do Carmo Costa*, do Ambulatório Médico;
- À *Elza Mitiko Sato*, bibliotecária responsável pelo Serviço de Comutação Bibliográfica;
- À *Maria do Carmo Junqueira*, diretora da biblioteca;
- Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação, em especial à *Rosana Miguel Gomes Ferro*;
- Aos funcionários do *Departamento de Biologia*.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Genética do IBILCE/UNESP de São José do Rio Preto, em especial às professoras *Dra. Nívea Dulce Tedeschi Conforti Froes, Dra. Cláudia Márcia Aparecida Carareto, Dra. Ana Elizabete Silva, Dra. Maria Tercília Vilela de Azeredo Oliveira.*

Aos *companheiros do Laboratório de Hemoglobinas e Genética das Doenças Hematológicas (LHGDH)* do IBILCE/UNESP de São José do Rio Preto, pela convivência amigável.

Agradeço em especial às pós-graduandas *Fátima Adriana Mendes Siqueira* e *Lya Bueno de Carvalho*, pela ajuda laboratorial e amizade. A presença de vocês tornou essa conquista em caminho mais leve. *Força sempre!*

À BIO-RAD, BIO-OXFORD, por fornecer os kits de diagnóstico laboratorial utilizados nos diferentes procedimentos.

Aos colegas do Programa de Pós-Graduação em Genética, particularmente à Profa. *Dra. Andréa Regina Baptista Rossit*, pela amizade e incentivo, sempre. Minha gratidão à *Paula e Rosa do Vale Bosso* pela amizade dentro e fora do Câmpus.

À Prof. *Érika Stupiello* pelas traduções e correções da língua inglesa, pela gentileza com que sempre me atendeu e especialmente pela amizade.

Ao *Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas e ao Programa de Pós-Graduação em Genética* do IBILCE/UNESP de São José do Rio Preto, pela oportunidade na realização desse projeto de pesquisa.

À todos a quem não me referi e que direta ou indiretamente participaram deste trabalho, o meu muito obrigada.

### **Agradecimentos Especiais**

À *Deus*, pela vida;

Aos meus pais *Dionísio Chinelato (in memorian) e Oneide de Oliveira Chinelato*, agradeço o amor e a presença, além do exemplo de conduta.

Ao meu esposo, *Atílio*, companheiro e maior incentivador, com quem compartilho todas as alegrias e dificuldades. Agradeço o amor, a paciência e a compreensão.

*Meu riso é tão feliz contigo  
O meu melhor amigo é o meu amor.*

Aos meus *irmãos, cunhadas, sobrinhos e afilhados* pelo incentivo e presença constante nos momentos difíceis e também alegres.

À *família Fernandes*, que me acolheu em suas vidas.

## Sumário

INTRODUÇÃO.....	14
I. Hemoglobinas normais.....	14
II. Hemoglobinas anormais.....	18
III. Formação da população brasileira.....	31
IV. Perspectivas futuras.....	32
V. Objetivos.....	34
MATERIAL E MÉTODOS.....	36
I. Casuística.....	36
II. Métodos de diagnóstico.....	37
III. Protocolos das técnicas utilizadas.....	41
RESULTADOS GERAIS.....	87
DISCUSSÃO GERAL.....	98
ARTIGOS ORIGINADOS	
© Avaliação eletroforética, cromatográfica e molecular da Hb D Los Angeles no Brasil.....	108
© Association of the Hb D-Los Angeles and beta-thalassemia identified by molecular evaluation.....	136
© Identificação de interação entre mutantes de Hemoglobina D-Los Angeles e Hemoglobina S por avaliação molecular.....	155
© Caracterização molecular da interação de Hemoglobinas Lepore e D-Los Angeles em núcleo familiar da população brasileira.....	168

© Associação de metodologias clássicas e moleculares para confirmação da Hemoglobina E em doador de sangue.....	183
© Utilização de diferentes metodologias de análise na caracterização da heterozigose para Hb Hasharon.....	199
CONCLUSÕES .....	215
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	218
ANEXOS.....	232
RESUMO .....	237
ABSTRACT.....	239

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

Nm	Nanômetro
DNA	Ácido desoxirribonucleico
LCR	Região Controladora de Locus
HS	Sítio hipersensível
DnaseI	Uma das enzimas que quebram as pontes do DNA
Kb	kilobases
Hb	Hemoglobina
MRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
PHHF	Persistência hereditária da hemoglobina fetal
2,3-BPG	2,3 -bifosfoglicerato
HPLC	Cromatografia líquida de alta pressão
RT	Tempo de retenção
BTS	Talassemia beta heterozigota
PCR	Reação em cadeia da polimerase
RFLP	Polimorfismo no tamanho do fragmento de restrição
ASO	Oligonucleotídeos alelo específicos
Qsp	Quantidade suficiente para
LHGDH	Laboratório de Hemoglobinas e Genética das Doenças Hematológicas
TEB	Tris-EDTA-Borato
IEF	Focalização Isoelétrica ou Isoeletrofocalização
TCA	Ácido tricloroacético
EDTA	Ácido etinodiaminotetracético
TE	Tris-EDTA
Taq	Nome da enzima proveniente da bactéria <i>Termus aquaticus</i>
SA-HRP	Estreptoavidina conjugada a peroxidase
TMB	Tetrametilbenzidina

## Introdução

## I. Hemoglobinas normais

A hemoglobina é uma proteína oligomérica, formada por quatro subunidades polipeptídicas individualizadas, que reúnem-se em um arranjo tetramérico característico. Análises com raios X revelaram que a molécula de hemoglobina é globular, com diâmetro de 5,5 nm e peso molecular de 64.500 daltons. Está presente nos glóbulos vermelhos dos vertebrados, os eritrócitos. Sua principal função é o transporte de oxigênio das vias respiratórias para os tecidos e de gás carbônico no sentido inverso. Nos seres humanos cerca de 96% das hemoglobinas do sangue arterial, que passam dos pulmões para os tecidos, encontram-se saturadas de oxigênio. Para as hemoglobinas do sangue venoso que retornam ao coração, esse valor corresponde a 64%. Portanto, as hemoglobinas liberam cerca de um terço das moléculas de oxigênio que transportam no trajeto dos pulmões aos tecidos (Lehninger et al., 1995).

As hemoglobinas são formadas pela conjugação de uma fração não protéica, o grupo heme, e de uma porção protéica, constituída pela cadeias globínicas. Cada cadeia globínica apresenta um grupo heme, que está parcialmente enterrado em uma fenda delimitada por radicais hidrofóbicos e unido à cadeia polipeptídica através de uma ligação de coordenação do átomo de ferro ao radical de um resíduo de histidina. A sexta ligação de coordenação do átomo de ferro de cada heme está livre para se ligar à molécula de O<sub>2</sub>. Essa estrutura mantém o ferro em estado ferroso (Fe<sup>++</sup>) e lhe dá a cor vermelha (Sampaio e Naoum, 1988; Lehninger et al., 1995; Naoum, 1999).

A fração protéica é formada por dois pares de cadeias polipeptídicas; duas delas possuem 141 aminoácidos cada e são denominadas de cadeias do tipo alfa. As outras duas, com 146 aminoácidos cada, são chamadas de cadeias do tipo beta. As cadeias globínicas possuem regiões definidas como internas e externas. Nas regiões internas, que constituem cerca de 75% da molécula, situam-se as dobraduras e o "pacote" do grupo heme, que o protege da entrada de água e conseqüente oxidação

do ferro. Essas regiões são muito sensíveis às substituições de um aminoácido por outro que apresente características diferentes, fenômeno que provoca a instabilidade da molécula e sua denaturação, podendo inclusive, alterar o processo de afinidade ao oxigênio (Rawn, 1989). As regiões externas estão situadas em locais em que a molécula não apresenta dobraduras; seus aminoácidos estabelecem contatos com o meio circundante e geralmente, a substituição de um aminoácido por outro não afeta a viabilidade da molécula nem sua função de transportar oxigênio.

Os genes que codificam as cadeias do tipo alfa formam uma família gênica ou *cluster* e estão localizados no braço curto do cromossomo 16, incluindo genes funcionais e pseudogenes: alfa ( $\alpha^1$ ,  $\alpha^2$ ,  $\psi\alpha^1$ ) e zeta ( $\psi\zeta^1, \zeta^2$ ). Pseudogenes são genes que possuem sequências homólogas aos genes estruturais ativos, mas contêm mutações que inibem sua expressão (Honig e Adams III, 1986; Lewin, 1997; Weatherall e Clegg, 2001). No feto e no indivíduo adulto, a taxa de expressão dos genes alfa2 e alfa1 é de 2,6:1. Os genes para as cadeias do tipo beta também formam um *cluster* e estão localizados no braço curto do cromossomo 11; incluem genes funcionais e pseudogenes: beta ( $\beta$ ,  $\psi\beta^1$ ), delta ( $\delta$ ), gama ( $\gamma A$ ,  $\gamma G$ ) e epsilon ( $\epsilon$ ) (Honig e Adams III, 1986; Lewin, 1997; Weatherall e Clegg, 2001).

Os genes dos *clusters* alfa e beta estão sujeitos à vários níveis de regulação. Eles se expressam exclusivamente nos eritrócitos em perfeita harmonia e por períodos bem definidos do desenvolvimento, assegurando o balanço correto de cadeias globínicas do tipo alfa e do tipo beta para a formação dos diferentes tipos de hemoglobinas. No *cluster* beta, esse controle é realizado por uma região de regulação do DNA, conhecida como Região Controladora de Locus (LCR), que consiste de cinco sítios hipersensíveis (HS) à DNaseI, localizada a 6-22 Kb na região anterior ou *upstream* ao gene epsilon (Harju et al., 2002). Essa sequência exerce atividades de estimulação, inibição ou atividades mais complexas, pela interação de fatores de transcrição com o DNA e a maquinaria da RNA polimerase. Muitos desses fatores são estudados e novas teorias para o processo de regulação têm sido desenvolvidas

(Cao e Moi, 2002). A regulação dos genes alfa se faz por meio de uma região conhecida como HS-40, correspondente à sítios hipersensíveis à DnaseI e de ligação de fatores de transcrição, localizada a 40 Kb *upstream* do *cluster* alfa (Jarman et al., 1991). Sua integridade é essencial para a expressão dos genes do *cluster* alfa localizado em posição posterior ou *downstream*. Os indivíduos com essas mutações apresentam um fenótipo semelhante aos portadores de talassemia alfa (Waye e Chui, 2001) (Figura 1).

As hemoglobinas diferenciam-se entre si por possuir características físico-químicas e mobilidades eletroforéticas distintas. As funções das hemoglobinas são marcantes desde os primeiros dias de gestação, adaptando-se ao constante desenvolvimento do embrião e feto, até estabilizarem-se por volta dos seis meses após o nascimento. A primeira hemoglobina embrionária sintetizada é a Hemoglobina (Hb) Gower 1 (constituída pelas cadeias globínicas  $\zeta_2\varepsilon_2$ ) que predomina nas quatro semanas iniciais. Até a décima segunda semana estão presentes as Hb Portland ( $\zeta_2\gamma_2$ ) e Hb Gower 2 ( $\alpha_2\varepsilon_2$ ). Após o período embrionário, não ocorre mais a síntese das hemoglobinas embrionárias, que podem estar presentes, no entanto, em pequenas quantidades em recém-nascidos normais, ou em grandes quantidades em crianças com aberrações cromossômicas, como é o caso da trissomia do cromossomo 13 (Bonini-Domingos, 1993; Weatherall, 1997).

Ainda no período embrionário inicia-se a síntese de hemoglobina Fetal ( $\alpha_2\gamma_2$ ), substituindo gradativamente, as hemoglobinas embrionárias e atingindo a sua plenitude por volta do terceiro mês de gestação. A Hb A ( $\alpha_2\beta_2$ ) começa a ser sintetizada à partir da décima semana mantendo-se em níveis não superiores a 10% na trigésima semana. Logo após o nascimento, as hemoglobinas Fetal e A apresentam concentrações próximas de 80 a 20%, respectivamente, cujas sínteses se invertem rapidamente até estabilizarem-se, em média, no sexto mês de vida pós natal. A Hb A<sub>2</sub> ( $\alpha_2\delta_2$ ) tem sua síntese iniciada no final do período fetal, e também se estabiliza no

sexto mês após o nascimento. Assim, nos adultos, a molécula de hemoglobina predominante é designada por Hb A, além de Hb A<sub>2</sub> e Hb Fetal em menor quantidade (Weatherall e Clegg, 1981; Honig e Adams III, 1986) (Tabela 1).

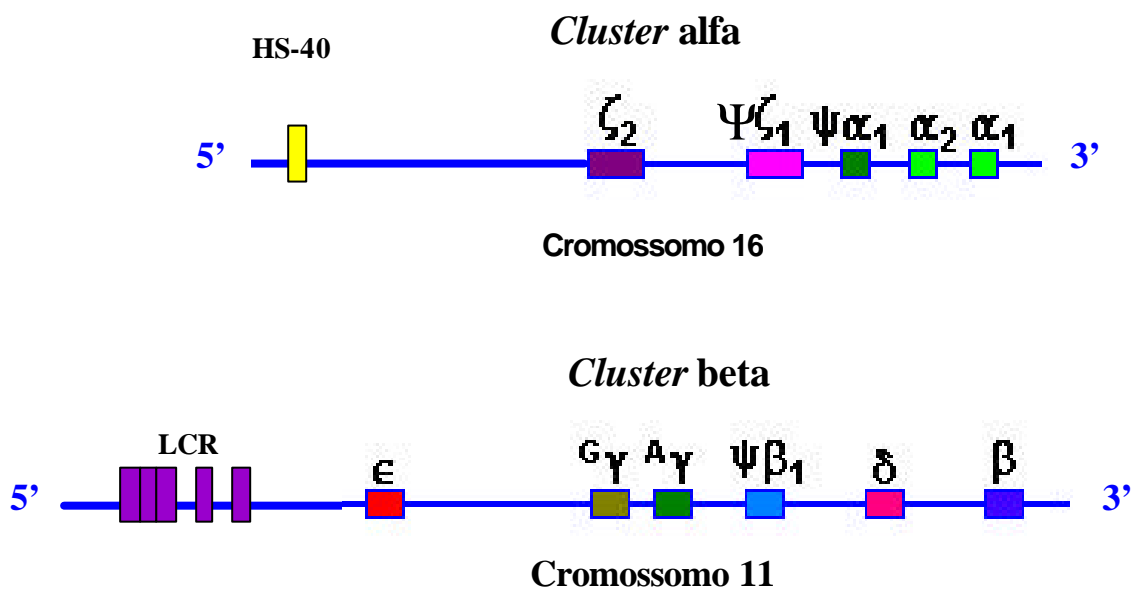


Figura 1. Representação esquemática dos *clusters* alfa e beta. O *cluster* alfa está localizado no cromossomo 16 e é composto pelos genes ( $\zeta_2$ ,  $\psi\zeta_1$ ,  $\psi\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  e  $\alpha_1$ ), além da região controladora HS-40. No cromossomo 11 encontra-se localizado o *cluster* beta, com os genes ( $\epsilon$ ,  $\gamma^G$ ,  $\gamma^A$ ,  $\psi\beta_1$ ,  $\delta$ ,  $\beta$ ) e a região controladora de locus (LCR) (modificado de [www.people.virginia.edu/~rjh9u/hgenemap.html](http://www.people.virginia.edu/~rjh9u/hgenemap.html)).

**Tabela 1. Hemoglobinas sintetizadas nos diferentes períodos do desenvolvimento humano**

Período do desenvolvimento	Nome da Hemoglobina	Globinas	Concentrações
Embrionário	Gower 1	$z_2e_2$	20-40%
	Portland	$z_2g_2$	5-20%
	Gower 2	$a_2e_2$	10-20%
Fetal	Fetal	$a_2g_2$	90-100%
Adulto	A	$a_2b_2$	96-98%
	A <sub>2</sub>	$a_2d_2$	2,5-3,5%
	Fetal	$a_2g_2$	0-1%

## II. Hemoglobinas anormais

As hemoglobinopatias podem ser divididas em três grandes grupos: as variantes ou hemoglobinas anormais, as talassemias e a persistência hereditária de hemoglobina fetal. As variantes são originadas em sua maioria, por alterações de um único nucleotídeo em genes estruturais, promovendo a formação de moléculas de hemoglobina com características bioquímicas diferentes das hemoglobinas normais. Nas talassemias, há uma redução da síntese de uma ou mais cadeias globínicas, acarretando um desequilíbrio nas quantidades relativas das cadeias. São classificadas de acordo com a cadeia globínica que está sendo ineficientemente sintetizada; entretanto, do ponto de vista da saúde pública, apenas as talassemias  $\alpha$  e  $\beta$  são clinicamente relevantes (Weatherall e Clegg, 2001). A talassemia alfa é originada na sua maioria por grandes deleções, que podem incluir todo o gene. A talassemia beta é causada principalmente por mutações em ponto, deleções ou inserções de poucos nucleotídeos (Hattori, 1999). A persistência hereditária da hemoglobina fetal (PHHF), pode ser originada por deleções e por mutações gênicas. As deleções envolvem grande parte dos genes do *cluster* beta e a maioria das mutações são encontradas na região promotora dos genes  $\gamma$  (Zamaro, 2002). Os indivíduos

portadores apresentam contínua síntese de Hb F em nível alto, mesmo após o nascimento. A anemia falciforme e algumas condições adquiridas, como leucemias, diabetes e doença de chagas, podem induzir a síntese de Hb F, entretanto, em níveis mais baixos que na PHHF (Bonini-Domingos, 1990; Rees et al., 1999).

As hemoglobinopatias são os distúrbios gênicos mais comuns, tornando-se um problema de saúde pública em vários países. Estima-se que 7% da população mundial seja portadora de um dos tipos de hemoglobinopatia. A identificação de mutantes é importante para facilitar o reconhecimento das consequências clínicas da homozigose ou heterozigose e ser útil para estudos da relação estrutura-função e aspectos genéticos e antropológicos, sendo utilizadas como marcadores genéticos (Schneider et al., 1976; Zago, 1987; Arends et al., 1990; Zago, 2000; Weatherall e Clegg, 2001).

Já foram descritas mais de 800 variantes (Wajcman et al., 2001), a maioria originada por simples substituições de aminoácidos, resultantes de mudanças nas sequências dos nucleotídeos. As alterações estruturais, com consequências nas atividades físico-químicas da molécula, estão na dependência da extensão do processo mutacional e dos locais em que esses ocorrem. Dessa forma, as hemoglobinas anormais podem originar-se por:

- a) substituição de um aminoácido por outro de característica diferente, na porção externa da molécula. Pode ocorrer também a substituição de dois aminoácidos em uma mesma cadeia, sendo, entretanto, condição muito rara. As substituições de aminoácidos na superfície externa, com exceção feita à hemoglobina S, não produzem alterações significativas no comportamento funcional da molécula;
- b) substituição de aminoácidos na porção interna da molécula, envolvendo resíduos polares e não polares, especialmente nos locais invariantes da molécula - incluindo aqueles que fazem parte do "pacote hidrofóbico" em torno do grupo heme, cuja principal função é protegê-lo da entrada de água - e aqueles que participam dos contatos  $\alpha 1 \beta 1$ . Qualquer substituição na região interna da

molécula causa instabilidade, geralmente iniciada pela oxidação do grupo heme, com formação de hemoglobinas instáveis;

- c) substituição de aminoácidos 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, provoca a formação de hemoglobinas com alterações na afinidade pelo oxigênio;
- d) substituição dos resíduos de histidinas distal ou proximal, que estão ligados ao grupo heme, ou de outros resíduos, que têm importância fundamental na constituição do "pacote" de aminoácidos que protege o grupo heme contra oxidação, causa anormalidades na molécula provocando excessiva formação de metemoglobina. A presença da metemoglobina pode causar cianose;
- e) adição de aminoácidos ao C-terminal das cadeias alfa e beta. Geralmente são causadas pela deleção de um nucleotídeo, que promove a alteração da matriz de leitura e muda a posição do códon de parada. A hemoglobina Constant Spring apresenta 31 resíduos a mais na cadeia alfa, e a hemoglobina Tak é uma molécula anormal com 10 resíduos a mais na cadeia beta (Naoum, 1999).

Outra causa de variantes estruturais ocorre por deleção de aminoácidos. Esse processo produz profundas alterações na molécula de hemoglobina, tornando-a instável. A fusão entre duas cadeias polipeptídicas diferentes também origina hemoglobinas variantes. A fusão de cadeias delta e beta resulta na formação de um tipo anormal de hemoglobina, a hemoglobina Lepore. A fusão de cadeias beta e delta, ou anti-Lepore, foi descrita em dois tipos de hemoglobinas anormais: Hb Miyada, com fusão de cadeia delta no resíduo 12 da cadeia beta, e Hb Nilotic com fusão no resíduo 22. A fusão de cadeias gama e beta foi descrita na hemoglobina Kenya, no resíduo 81 da cadeia gama, e na Hb Steinheim, no resíduo 121.

A perda espontânea de aminoácidos, resultando em hemoglobina variante, foi relatada na Hb Koellicker, onde o resíduo C-terminal da cadeia alfa, a arginina, separa-se do resto da cadeia e pode ser detectada na urina.

A grande maioria das hemoglobinas variantes origina-se por substituição de um único aminoácido da cadeia polipeptídica. Poucas dessas variantes encontram-se associadas a manifestações clínicas e/ou hematológicas que, quando presentes, têm seu grau de expressão intimamente relacionado ao local e extensão da mutação; assim as hemoglobinas variantes podem ser classificadas baseadas em suas características funcionais, em cinco grupos:

**Grupo 1: Hemoglobinas sem alterações fisiológicas:** Esse grupo é constituído pela maioria das variantes e, embora essas hemoglobinas sejam de interesse bioquímico, genético e antropológico, não produzem efeitos clínicos significativos nem alterações hematológicas.

**Grupo 2: Hemoglobinas de agregação:** As hemoglobinas S e C apresentam, respectivamente, a formação de tactóides e cristais, com repercussões clínicas e hematológicas variáveis.

**Grupo 3: Hemoglobinas instáveis:** As hemoglobinas instáveis apresentam graus variáveis de manifestações clínicas e hematológicas, expressando-se laboratorialmente por meio de intensa instabilidade molecular quando submetidas ao calor ou agentes químicos, e pela presença de corpos de inclusão nos eritrócitos.

**Grupo 4: Hemoglobinas com alterações funcionais:** Esse grupo inclui as hemoglobinas que causam metemoglobinemias por Hb M e alterações na afinidade pelo oxigênio.

**Grupo 5: Hemoglobinas variantes com fenótipo talassêmico:** As hemoglobinas Lepore e Constant Spring são duas formas variantes que apresentam fenótipos de talassemias beta e alfa, respectivamente (Bonini-Domingos, 1993).

Dentre as variantes mais frequentes, destacamos as seguintes:

- **Hemoglobina S**

A hemoglobina S é causada por uma mutação no gene da beta globina, produzindo uma alteração estrutural na molécula. No gene da globina beta S, há a

alteração de um códon (GAG  $\rightarrow$  GTG), resultando na substituição do ácido glutâmico (Glu), na posição 6 da cadeia por valina (Val). O ácido glutâmico é carregado negativamente enquanto a valina é um aminoácido neutro, ou seja, há uma perda de duas cargas negativas por molécula de hemoglobina. Essa troca resulta em uma mobilidade mais lenta da Hb S quando comparada com a Hb A em eletroforeses de pH alcalino e ácido (Bonini-Domingos, 1993).

Os heterozigotos são assintomáticos; entretanto, os homozigotos manifestam anemia grave. A eletroforese em pH alcalino é o método mais sensível para detecção de Hb S. Entretanto, a detecção de uma fração de hemoglobina na posição de Hb S deve ser comprovada por métodos específicos que caracterizem esta hemoglobina, pois na mesma posição, em pH alcalino migram várias outras hemoglobinas anormais como: Hb D, Hb G, Hb Korle-Bu, Hb Lepore, Hb Hasharon e Hb Stanleyville (Naoum, 1999).

- **Hemoglobina C**

A hemoglobina C é uma hemoglobina anormal originada por uma alteração na primeira base da trinca (GAG  $\rightarrow$  AAG), que leva à substituição do ácido glutâmico (Glu) na hemoglobina normal, por uma lisina (Lys), também na posição 6 da cadeia beta. A troca de um aminoácido de carga negativa por outro de carga positiva altera sensivelmente a mobilidade eletroforética da hemoglobina, sendo facilmente diferenciável da Hb A em pH alcalino e ácido. É frequente em povos da África Ocidental, onde atinge valores de 15 a 30%. Os heterozigotos (Hb AC) são assintomáticos, não possuem anemia e não apresentam evidências de diminuição do número de eritrócitos.

Como outras hemoglobinas anormais migram na mesma posição da Hb C em eletroforese em pH alcalino, devido à semelhança de suas cargas elétricas, uma diferenciação adicional deve ser realizada. O diagnóstico de portadores heterozigotos é fundamental do ponto de vista do aconselhamento genético, já que a homozigose ou

a associação com outras hemoglobinas anormais, pode levar a alterações clínicas detectáveis (Naoum, 1999).

Um grande número de variantes de hemoglobinas tem sido descoberto com frequência, graças ao aperfeiçoamento técnico para detecção de novos mutantes. A grande maioria desses mutantes não causa alterações fisiopatológicas, e grande parte deles foi descoberta em estudos populacionais ou em associação com talassemias e Hb S. Dentre as hemoglobinas classificadas nesse grupo podemos citar as hemoglobinas D, G, E, J (Bonini-Domingos, 1993).

- **Hemoglobina D-Los Angeles**

Até o início da década de 50, haviam sido descritos apenas três tipos de hemoglobinas: a Hb A, que é a molécula normal e duas variantes, a Hb S e Hb C. A quarta hemoglobina descrita foi a Hb D, descoberta em 1951 por Itano, em uma família proveniente da região de Los Angeles (*apud* Vella e Lehmann, 1974). A Hb D descrita nessa família foi originada por uma troca do aminoácido na posição 121 da cadeia beta, no qual um ácido glutâmico (Glu) era substituído por uma glutamina (Gln). Essa variante apresentava mobilidade eletroforética idêntica a Hb S em pH alcalino e semelhante a Hb A em pH ácido; solubilidade normal quando em estado reduzido e ausência de falcização dos eritrócitos (Vella e Lehmann, 1974). Em 1962, Baglioni (*apud* Politis-Tsegos et al., 1975; El Kalla e Mathews, 1997) examinou 5 tipos de Hb D, provenientes de diversas regiões e diferentes origens étnicas, chamadas D-Chicago, D-North Carolina, D-Punjab, D-Portugal e D-Oak Ridge, e verificou que todas apresentavam a mesma alteração: uma transversão GAA  $\rightarrow$  CAA ao nível do DNA, que resultava na troca do ácido glutâmico pela glutamina na posição 121 da cadeia beta.

O reservatório natural dessa variante ocorre na região de Punjab, na Índia, onde estima-se que 3% da população seja portadora heterozigota (Zeng et al., 1989; Perea et al., 1999). Essa hemoglobina anormal foi encontrada em menor

quantidade em outros países, tais como Afeganistão e Irã, o que pode ser devido à proximidade com a Índia. Não se pode precisar a origem dessa Hb D, mas um estudo utilizando polimorfismos moleculares sugere que a região de Punjab deva ser o berço dessa variante e que sua dispersão para as outras regiões do mundo deveu-se à migração (Fioretti et al., 1993; Das e Talukder, 2001). Assim, os nomes Hb D-Los Angeles ou Hb D-Punjab são atualmente os mais utilizados. Essa hemoglobina é a variante D mais comumente encontrada e a quarta variante de cadeia beta mais freqüente (Moscoso et al., 1990). Esses achados demonstram que essa hemoglobina possui uma ampla distribuição mundial. Na América Latina, essa hemoglobina foi descrita no Brasil, Argentina, Cuba, Guadalupe, Jamaica, Venezuela e México (Perea et al., 1999). Pelos dados obtidos na população brasileira, é a terceira variante mais prevalente, depois das Hb S e Hb C (Leoneli, 2001).

A Hb D-Los Angeles foi descrita tanto em heterozigose como em homozigose, assim como em combinação com Hb S e as talassemias alfa ou beta. A heterozigose para Hb D-Los Angeles é caracterizada pela ausência de sintomatologia clínica, sendo na maioria das vezes diagnosticada por estudo familiar e mais frequentemente em rastreamentos populacionais. O estado homozigoto, que constitui uma situação extremamente rara, pode apresentar desde parâmetros clínicos e hematológicos normais até uma anemia hemolítica branda, com diminuição da fragilidade osmótica, presença de algumas células em alvo e níveis de hemoglobina normais (Ozsoylu, 1970; Politis-Tsegos et al., 1975; El-Kalla e Mathews, 1997). O nível de Hb D geralmente está acima de 95% e esses indivíduos apresentam quantidades normais de Hb A<sub>2</sub> (El-Kalla e Mathews, 1997; Ahmed et al., 2001).

Os indivíduos portadores da associação entre Hb S e D, chamada doença de Hb SD, apresentam grande diversidade clínica, podendo variar de manifestações brandas, com anemia discreta, até anemia hemolítica grave, com clínica similar aos pacientes com anemia falciforme, tais como esplenomegalia, hepatomegalia e crises tromboticas (Fodor e Eng, 1999; Perea et al., 1999; Athanasiou-Metaxa et al., 2002), além de doenças cerebrovasculares oclusivas e

paralisia (Schmugge et al., 2001). Embora a Hb D não sofra falcização, o fenótipo severo associado à doença de Hb SD pode ser devido a um aumento na polimerização da Hb S, que é facilitado pela mutação no códon 121 (Adachi et al., 1988; Fodor e Eng, 1999; Ahmed et al., 2001). O diagnóstico correto, rastreamento neonatal e aconselhamento genético realizados por profissionais especializados são recomendados para amenizar os distúrbios clínicos e possibilitar uma condição normal aos portadores (Leoneli, 2001).

Os portadores de Hb D e talassemia beta apresentam microcitose e anemia hemolítica de leve à moderada (Fodor e Eng, 1999; Perea et al., 1999; Ahmed et al., 2001). A interação de Hb D com talassemia beta pode ser confundida com homozigose, devendo ser confirmada através de análise molecular e estudo familiar para evitar-se um diagnóstico equivocado (Ozsoylu, 1970; Politis-Tsegos et al., 1975; Perea et al., 1999; Ahmed et al., 2001). A co-herança de Hb D e talassemia beta é muito rara, com poucos casos descritos na literatura mundial. Foram descritos um caso no Canadá, três em Portugal, um na Inglaterra, um na Espanha, três no Kuwait, um na Índia, um na Rússia e dois na Arábia Saudita (Ahmed et al., 2001).

Outros tipos de Hb D são: D-Buschman, D-Ouled Rabah, D-Iran, D-Granada, D-Ibadan, D-Camperdown e D-Neath (Tabela 2). Como as Hb D compreendem um grande grupo de variantes de cadeia beta com comportamentos eletroforéticos similares, a distinção entre os diferentes tipos de Hb D requer técnicas específicas de análise (Huisman, 1990; Huisman, 1992).

**Tabela 2: Diferentes tipos de Hemoglobina D, a localização da mutação e a substituição resultante.**

Hemoglobinas D	Mutação	Substituição do Aminoácido
D-Buschman	$\beta$ 16	Gly $\rightarrow$ Arg
D-Ouled Rabah	$\beta$ 19	Asn $\rightarrow$ Lys
D-Granada	$\beta$ 22	Glu $\rightarrow$ Val
D-Iran	$\beta$ 22	Glu $\rightarrow$ Gln
D-Ibadan	$\beta$ 87	Thr $\rightarrow$ Lys
D-Neath	$\beta$ 121	Glu $\rightarrow$ Ala
D-Camperdown	$\beta$ 121	Glu $\rightarrow$ Val
D-Los Angeles, D-Punjab, D-Portugal, D-North Carolina, D-Oak Ridge, D-Chicago	$\beta$ 121	Glu $\rightarrow$ Gln

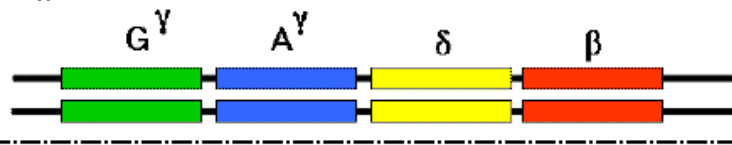
- **Hemoglobina Lepore**

A hemoglobina Lepore foi descrita em 1958 por Gerald e Diamond em indivíduos de origem italiana (*apud* Miranda et al., 1994). A análise estrutural mostrou que essa variante representa um grupo de hemoglobinas anormais que consistem de duas cadeias alfa e duas cadeias globínicas híbridas  $\delta\beta$ . A proteína apresenta a sequência N-terminal da cadeia  $\delta$  e C-terminal da cadeia  $\beta$ . Essa globina é o produto do gene híbrido, resultante da fusão da porção 5' do gene  $\delta$  e 3' do gene  $\beta$ . É provável que tenha ocorrido uma permuta ou *crossing-over* desigual entre os loci  $\delta$  e  $\beta$ , levando a uma deleção de 7.4 Kb durante a meiose (Miranda et al., 1994; Ribeiro et al., 1997) (Figura 2).

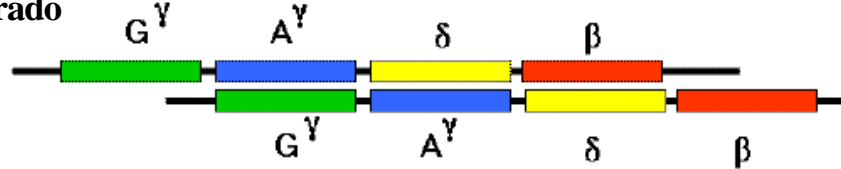
Essa hemoglobina apresenta mobilidade eletroforética semelhante à Hb S em pH alcalino. A identificação e quantificação é realizada com a utilização da cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) (Ropero et al., 1999). Os indivíduos heterozigotos apresentam fenótipo similar aos portadores de talassemia beta, ou seja, anemia microcítica e hipocrômica branda, com um pequeno aumento de Hb F, enquanto os homozigotos apresentam anemia grave (Ribeiro et al., 1997). Já foram relatadas associações entre Hb Lepore e Hb S; os fenótipos variaram de assintomáticos até quadros com anemia, icterícia, hepatoesplenomegalia e dores ósseas (Murad et al., 1992).

Três tipos estruturalmente distintos, dependendo do ponto de *crossing* foram descritos. A Hb Lepore Washington-Boston ( $\delta^{87}\text{Glu}-\beta^{116}\text{His}$ ), é a mais frequentemente observada em diferentes grupos étnicos, como italianos, ingleses, mexicanos, gregos, turcos, romenos, cubanos; os indivíduos heterozigotos podem apresentar anemia branda, com microcitose e hipocromia; já foi descrita em associação com Hb S, Hb C, talassemia beta e em homozigose. Em associação com Hb S, parece induzir de forma branda, a falcização (Miranda et al., 1994; Huisman et al., 1996; Ribeiro et al., 1997). Os heterozigotos para a Hb Lepore Baltimore ( $\delta^{50}\text{Ser}-\beta^{86}\text{Ala}$ ) apresentam anemia leve, com microcitose e hipocromia; é encontrada principalmente entre africanos, espanhóis e iugoslavos; já a Hb Lepore Holanda ( $\delta^{22}\text{Ala}-\beta^{50}\text{Thr}$ ) parece ser a mais rara; os portadores apresentam microcitose e hipocromia brandas; essa variante foi encontrada em famílias da Nova Guiné e Canadá (Miranda et al., 1994; Huisman et al., 1996; Ribeiro et al., 1997). Técnicas de biologia molecular são necessárias para identificação do tipo de Hb Lepore (Ropero et al., 1999).

### Pareamento normal



### Pareamento alterado



### Crossing over desigual

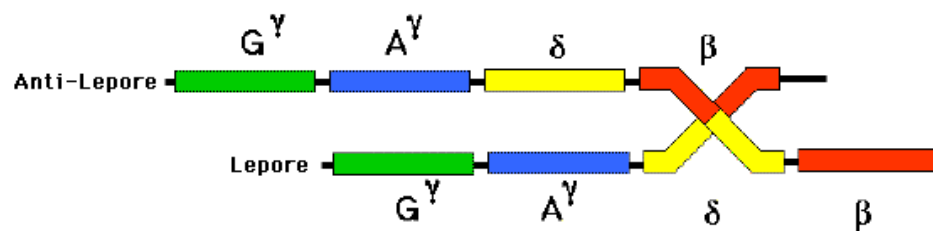


Figura 2. Representação esquemática do pareamento normal dos genes que constituem o *cluster* beta, do pareamento alterado desses genes e do *crossing over* desigual entre os genes  $\delta$  e  $\beta$ , que leva à formação do gene Lepore ([www.irm.pdx.edu/~newmanl/Lepore.gif](http://www.irm.pdx.edu/~newmanl/Lepore.gif)).

- **Hemoglobina G-Philadelphia**

A Hb G-Philadelphia é um mutante de cadeia alfa que migra de forma semelhante à Hb S em eletroforese em pH alcalino. Na eletroforese em pH ácido, essa variante migra juntamente com a Hb A. Na cadeia globínica há uma substituição do aminoácido asparagina por lisina no códon 68; essa troca se deve às mutações na terceira base da trinca - AAC  $\Pi$  AAG ou AAA. A mutação AAG parece estar associada a uma deleção de 3.7 Kb, unindo os dois genes alfa, originando um gene híbrido. A outra mutação ocorre no gene alfa 2 do cromossomo com complemento normal de genes alfa (Morle et al., 1984; Molchanova et al., 1994; Huisman et al., 1996).

Os indivíduos heterozigotos são geralmente assintomáticos; no entanto, alguns podem apresentar microcitose. Os homozigotos apresentam microcitose e hipocromia. Essa variante já foi descrita em associação com mutantes de cadeia beta, como por exemplo, Hb C e Hb S. A Hb G-Philadelphia parece acelerar a formação de cristais de Hb C enquanto diminui a falcização da Hb S (Lawrence et al., 1997). Sua ocorrência é maior em negros e italianos.

- **Hemoglobina Hasharon**

A Hb Hasharon, da mesma forma que a Hb G-Philadelphia é um mutante de cadeia alfa que migra de forma semelhante à Hb S na eletroforese em pH alcalino. Entretanto, na eletroforese em pH ácido, essa variante migra entre as Hb S e Hb C. A origem dessa mutação é uma troca na primeira base da trinca GAC  $\Pi$  CAC no códon 47 do gene alfa 2. Na proteína, essa alteração leva à uma substituição do ácido aspártico por histidina. Os indivíduos heterozigotos são assintomáticos. Essa variante apresenta maior ocorrência em judeus Ashkenazi e italianos (Huisman et al., 1996).

- **Hemoglobina E**

A Hb E foi relatada pela primeira vez por Chernoff e colaboradores em 1954 na Tailândia (*apud* Rees et al.,1998). É originada por uma alteração no gene

beta (GAG  $\rightarrow$  AAG) onde o aminoácido ácido glutâmico da posição 26 é substituído por uma lisina na cadeia globínica. Essa mutação cria um sítio de processamento ou *splicing* anormal e reduz drasticamente a formação do mRNA (Steger et al., 1993; Shirohzu et al., 2000). Na eletroforese em pH alcalino, essa variante migra na mesma posição que a Hb A<sub>2</sub> e Hb C e a diferenciação deve ser iniciada por eletroforese em pH ácido.

Os indivíduos heterozigotos podem ser assintomáticos; no entanto, microcitose e algumas células em alvo podem ser notadas. Alguns indivíduos portadores dessa variante podem apresentar icterícia e febre; a esplenomegalia parece ser comum aos indivíduos com quaisquer sintomas. A anemia microcítica branda com muitas células em alvo é encontrada nos indivíduos homozigotos (Piplani, 2000). Isso pode ser explicado pela natureza talassêmica do alelo  $\beta^E$ . Nos indivíduos que herdam a Hb E juntamente com a talassemia beta, a manifestação clínica é muito variável. Pacientes com sintomas brandos, evoluem normalmente sem a necessidade de transfusões sanguíneas, enquanto outros apresentam anemia, retardo no crescimento, hepatoesplenomegalia com sobrecarga de ferro e dependência de transfusão (Rees et al., 1998; Fucharoen et al., 2000).

A Hb E é a variante mais comum na Ásia, desde o norte da Índia até a China, variando de 9 a 60% da população em diferentes regiões da Tailândia (Pung-Amritt et al., 1999; Fucharoen et al., 2002).

- **Hemoglobina J**

A hemoglobina J é uma variante com mobilidade eletroforética bem característica em pH alcalino, sendo mais rápida que Hb A; foram relatados vários tipos de Hb J, todos apresentando as mesmas características de mobilidade no pH alcalino. Por eletroforese de cadeias globínicas é possível identificar sua origem molecular, que pode ser por substituição de aminoácidos tanto na cadeia alfa como na cadeia beta.

Até 2002 haviam sido descritas 43 variantes de Hb J. A Hb J-Baltimore ( $\beta^{16}$  Gly  $\Pi$  Asp) é a mais comumente encontrada e a Hb J-Paris I ( $\alpha^{12}$  Ala  $\Pi$  Asp) é uma das variantes de cadeia alfa mais comuns (Moscoso et al., 1990; Huisman et al., 1996).

Entre as variantes de Hb J, destacam-se três que têm sido identificadas em diferentes regiões do Brasil, em heterozigose: Hb J Oxford ( $\alpha^{15}$ Gly  $\Pi$  Asp), Hb J Rovigo ( $\alpha^{53}$ Ala  $\Pi$  Asp) e Hb J Baltimore (Silva Jr. et al., 1992; Naoum, 1999).

A hemoglobina J Oxford é também conhecida como Hb I Interlaken; no DNA ocorre uma mutação na segunda base da trinca GGT  $\Pi$  GAT, levando à substituição de glicina por ácido aspártico na proteína; os indivíduos heterozigotos são assintomáticos. Ocorre principalmente entre os indivíduos descendentes de ingleses e italianos (Huisman et al., 1996).

A Hb J Bangkok é um exemplo de Hb J mutante de cadeia beta; a alteração que origina essa variante ocorre na segunda base da trinca GGC  $\Pi$  GAC, levando à mudança de glicina para ácido aspártico no produto gênico. Os heterozigotos não apresentam quaisquer sintomas clínicos e sua ocorrência é maior em negros, chineses, indonésios e tailandeses (Huisman et al., 1996; Fucharoen et al., 2001).

Os mutantes de cadeia alfa apresentam em eletroforese a Hb J com concentração próxima a 25% e um componente menor, a Hb J<sub>2</sub>, oriunda da combinação de cadeias alfa<sup>J</sup> e delta, que migra entre as posições de Hb A<sub>2</sub> e Hb S. O mutante de cadeia beta apresenta a fração J com concentração entre 30 e 45%.

### III. Formação da população brasileira

As populações latino-americanas apresentam variações étnicas predominantemente oriundas do cruzamento entre indígenas e colonizadores espanhóis e portugueses e posteriormente, negros africanos. No Brasil, além desses grupos, recebemos também a influência de outros imigrantes europeus, principalmente alemães e italianos, além de asiáticos (Naoum,1982).

A população brasileira caracteriza-se por apresentar grande heterogeneidade genética, derivada da contribuição que lhe deram os seus grupos raciais formadores e dos diferentes graus com que se inter cruzaram nas várias regiões do país. Esse fato permitiu a dispersão de genes anteriormente característicos de povos negróides ou caucasianos, que foram transmitidos gradualmente à medida que se intensificava o processo de colonização em nosso país. Assim, acredita-se que a contínua atividade miscigenatória tenha facilitado a propagação das hemoglobinas anormais, cuja distribuição heterogênea pode ser explicada conforme a região colonizada e a proveniência nacional dos seus colonizadores (Naoum et al., 1986; Salzano, 2000).

Um estudo de herança genética em mais de 400 negros, realizado por meio de marcadores genéticos associados à origem da mutação no gene da globina que leva à anemia falciforme, confirmou que os negros brasileiros são predominantemente bantos, ou seja, provenientes do sul e sudoeste da África; entretanto, no Pará, existem menos bantos do que o esperado, pois muitos negros provenientes de outras regiões africanas foram comprados nos portos do Rio de Janeiro e levados para lá (Zago, 2000). As diferenças regionais quanto à procedência dos escravos africanos foi modificada não apenas pelo tráfico estabelecido entre as diferentes regiões mas também pelos movimentos migratórios internos, especialmente nordestinos (Pante de Souza, et al., 1998). Atualmente, os negros brasileiros têm características genéticas próprias, com considerável contribuição de outros povos (Zago, 2000).

A diversidade genética da população brasileira reflete-se no polimorfismo das hemoglobinas. Assim, a detecção dos indivíduos portadores de hemoglobinopatias e sua correta caracterização são importantes do ponto de vista genético-antropológico e de suporte clínico. Os indivíduos portadores, além de representarem fonte de novos heterozigotos, podem, através de casamentos entre portadores, originar indivíduos homozigotos e duplos heterozigotos com a forma grave da doença. Esses indivíduos, quando identificados previamente, são encaminhados para profissional especializado, facilitando a orientação quanto ao risco para a descendência, o tratamento e o aconselhamento genético (Álvares Filho, 1987; Rocha, 2000).

#### **IV. Perspectivas Futuras**

Cada metodologia de análise utilizada até o momento apresenta vantagens e limitações. Assim considerando-se, faz-se necessária a associação de metodologias clássicas e moleculares para o diagnóstico adequado das variantes de hemoglobinas, esclarecendo dessa forma as diferentes alterações que podem afetar a síntese das hemoglobinas. As metodologias laboratoriais existentes vêm sendo aperfeiçoadas, bem como novas delas têm sido desenvolvidas, auxiliando no diagnóstico e entendimento dos processos fisiopatológicos que acometem alguns portadores de hemoglobinas variantes.

Os programas de triagem neonatal iniciaram-se na década de cinquenta, orientados para doenças metabólicas como fenilcetonúria; a partir deste período, as triagens populacionais ganharam importância no campo preventivo. Geralmente os programas preventivos para hemoglobinopatias incluem educação em nível populacional, familiar e profissional, aconselhamento genético dos portadores e casais de risco e acompanhamento clínico adequado à cada caso. Assim, o programa de triagem neonatal é importante para a identificação precoce dos portadores,

realização de aconselhamento genético aos pais, informando-os sobre a chance de virem a ter outros filhos afetados, orientação aos pais sobre os sinais e sintomas precoces das complicações e identificação de outros portadores na família (Siqueira et al, 2002).

A hidroxiuréia é uma droga utilizada no tratamento de doenças mieloproliferativas e alguns tumores sólidos, e nos últimos anos têm-se obtido bons resultados com o seu uso para anemia falciforme, induzindo-se quimicamente a síntese de hemoglobina fetal, que diminui os problemas decorrentes da falcização da Hb S (Al-Jam'a et al., 2002). Entretanto, alguns autores relatam efeitos adversos decorrentes do uso contínuo da hidroxiuréia, como gangrena dos artelhos e dedos, meningiomas e leucemia mielóide crônica (Al-Jam'a et al., 2002; Giordano et al., 2002; Leo et al., 2002). O transplante de medula óssea poderá ser realizado para a remoção das células originais e implante de novas células precursoras dos eritrócitos, sem o defeito genético; entretanto, este procedimento apresenta inúmeras dificuldades, que precisam ser superadas para que possa tornar-se um procedimento viável. A terapia gênica visa a correção do defeito genético nessas mesmas células, para que as células do próprio indivíduo possam se diferenciar e sintetizar hemoglobinas normais. Com a transferência gênica, poderia obter-se um nível mais alto de síntese do gene gama e conseqüentemente um aumento de Hb F, de forma permanente. Para isso entretanto, é necessário que haja a transferência eficiente do gene alvo, do vetor para as células humanas e que após a transferência, esse gene possa ser ativado. Desse modo, para o sucesso da terapia gênica, devem ser transferidos não apenas os genes, mas também a região reguladora dos genes em questão. Muitos estudos estão sendo realizados para o desenvolvimento de novas estratégias de transferências mais eficientes e seguras (Lung et al., 2000).

## V. Objetivos

1. identificar as isoformas de hemoglobinas por meio de procedimentos eletroforéticos em diferentes pH e isoeletrofocalização;
2. comparar os resultados dos perfis eletroforéticos com os obtidos por HPLC;
3. caracterizar a globina mutante por eletroforese de cadeias polipeptídicas ou HPLC;
4. realizar a caracterização da mutação por PCR-RFLP e PCR-ASO, além de sequenciamento.

## Material e Métodos

## I. Casuística

Foram analisadas 220 amostras de sangue periférico, sendo 114 provenientes de indivíduos do sexo masculino e 106 do sexo feminino, com idades que variaram de recém nascidos até 65 anos. Essas amostras, oriundas de diferentes estados do Brasil, foram encaminhadas ao Laboratório de Hemoglobinas e Genética das Doenças Hematológicas (LHGDH) – UNESP, com suspeita de hemoglobinopatias. O sangue foi coletado em frasco estéril com anticoagulante EDTA 5%, após consentimento informado. Para a determinação da variante, foram realizados testes de triagem, que consistiram de resistência globular osmótica em NaCl a 0,36%, análise da morfologia eritrocitária à fresco e eletroforese alcalina em acetato de celulose utilizando-se tampão Tris-EDTA-borato em pH 8,5. Como procedimento de confirmação, foram realizadas as eletroforeses em ágar com tampão fosfato pH 6,2, de cadeias globínicas em acetato de celulose com tampão Tris-EDTA-borato, uréia e mercaptoetanol, focalização isoeétrica em gel de agarose e cromatografia líquida de alta pressão (HPLC), com o equipamento VARIANT (BIO-RAD), utilizando-se o kit de diagnóstico para talassemia beta heterozigota.

Para as análises moleculares, o DNA foi obtido dos glóbulos brancos através do método de extração fenólica e o DNA amplificado através da reação em cadeia da polimerase. Após a amplificação, o material foi digerido com endonucleases de restrição específicas para cada variante. Os casos duvidosos foram submetidos a reação de sequenciamento. Na presença de associação com outras variantes ou talassemias, foram realizados testes moleculares por PCR-ASO, com kits *mD<sub>x</sub>* (BIO-RAD) para confirmação.

## II. Métodos de diagnóstico

O método geralmente empregado para análise preliminar de variantes de hemoglobinas é a eletroforese em acetato de celulose, com solução tampão alcalino. É a técnica amplamente utilizada por ser rápida e de baixo custo para uso na investigação de variantes de hemoglobinas. (Basset et al., 1978; Wada, 1992; Ou e Rognerud, 1993). Cadeias globínicas mutantes que diferem das cadeias normais em sua carga elétrica total são rapidamente diferenciadas. Entretanto, um grande número de variantes com significado clínico apresenta substituições que não alteram a carga da proteína. Além disso, algumas mutações podem causar alterações na estrutura tridimensional da molécula (Wada, 1992). Algumas variantes co-migram nesse pH como é o caso das Hb A<sub>2</sub>, C, O e E, e Hb S, D e G. Assim, sua sensibilidade é limitada, sendo necessários testes complementares. A eletroforese em pH ácido pode auxiliar na diferenciação de algumas das hemoglobinas acima citadas, como as Hb C e E ou S e D; entretanto, não é possível a diferenciação das Hb E e O ou D e G (Ou e Rognerud, 1993).

A cromatografia, com o uso da cromatografia líquida de alta pressão (HPLC), detecta uma alteração na hidrofobicidade da molécula total (Wada, 1992). Essa técnica fornece dados qualitativos das hemoglobinas variantes, mesmo que essas estejam presentes em pequenas quantidades, tornando-se um método importante para o diagnóstico diferencial das hemoglobinopatias. O programa para detecção de talassemia beta heterozigota (BTS) do equipamento VARIANT (BIO-RAD) separa e determina em 6 minutos e meio a porcentagem de Hb A<sub>2</sub> e Hb F, e fornece dados qualitativos e quantitativos sobre algumas variantes de hemoglobinas, que são eluídas da coluna cromatográfica nas suas respectivas janelas, com os tempos de retenção específicos de cada fração de hemoglobina da amostra. No entanto, tal técnica não apresenta resolução necessária para diferenciar algumas hemoglobinas variantes, tais como Hb E e Lepore da Hb A<sub>2</sub> (Ou e Rognerud, 1993; Molteni et al., 1994; Riou et al., 1997).

Várias estratégias moleculares podem ser utilizadas para o diagnóstico adequado das variantes de hemoglobinas. Para Hb D-Los Angeles, Saiki et al. (1988) e Aulehla-Scholz et al. (1989), citados por Schnee et al. (1990), confeccionaram os iniciadores ou *primers* denominados CD1 e CD2 para a amplificação do éxon 3 do gene da globina beta. Após amplificação, segue-se a digestão enzimática com a endonuclease de restrição *EcoRI*. A mutação ocorrida na Hb D-Los Angeles abole o sítio de corte da enzima; desse modo, o indivíduo normal apresentará duas bandas com 268 e 296 pares de bases, que correspondem aos alelos normais clivados pela enzima; no indivíduo heterozigoto haverá além das bandas provenientes do alelo normal digerido, uma banda com 564 pares de bases correspondente ao alelo mutante, que não possui o sítio de reconhecimento para *EcoRI*.

Uma técnica que pode ser utilizada para confirmação das Hb S e C, é a hibridação por meio de oligonucleotídeos alelo específicos (ASO). Essa técnica possui sensibilidade para discriminar as sequências do alelo A (GAG), S (GTG) e C (AAG) no códon 6 do gene da beta globina. A detecção de mutações é baseada na hibridação e lavagem de um oligonucleotídeo sintético que formará um duplex estável com a sequência de DNA alvo, somente se todos os pares de base no duplex forem perfeitamente pareados. Um oligonucleotídeo alelo específico para o alelo A irá hibridar somente com aquele alelo, e não com os alelos S e C. Da mesma forma, os alelos S e C, somente hibridarão com os oligonucleotídeos específicos. O kit “mDx Variant Gene S e C” (BIO-RAD) fornece todos os reagentes necessários, além de um manual para interpretação dos resultados. Os kits mDx estão disponíveis também para a identificação de 16 mutantes que originam talassemia beta.

A combinação de várias técnicas, como eletroforese em pH alcalino, eletroforese em pH ácido, isoeletrofocalização, eletroforese de cadeias globínicas, HPLC, além de estudos estruturais e moleculares parecem ser necessários para a identificação acurada das variantes de hemoglobina, uma vez que cada uma das técnicas citadas, isoladamente, apresentam limitações na identificação das hemoglobinas anormais, pois a co-migração pode subestimar a frequência de algumas

variantes (Moscoso et al., 1990; Clarke e Higgins, 2000; Wajcman, et al., 2001). A figura 3 mostra um fluxograma proposto pelo LHGDH com as estratégias de análise para o estudo de variantes de hemoglobinas.

A ocorrência de associações de variantes exige que todos os recursos diagnósticos, em nível laboratorial, sejam utilizados em benefício do paciente e seus familiares. O esclarecimento diagnóstico desses casos é de fundamental importância, tanto para o correto aconselhamento genético quanto para se evitar tratamentos inadequados ou desnecessários dos seus portadores (Murad et al., 1992).

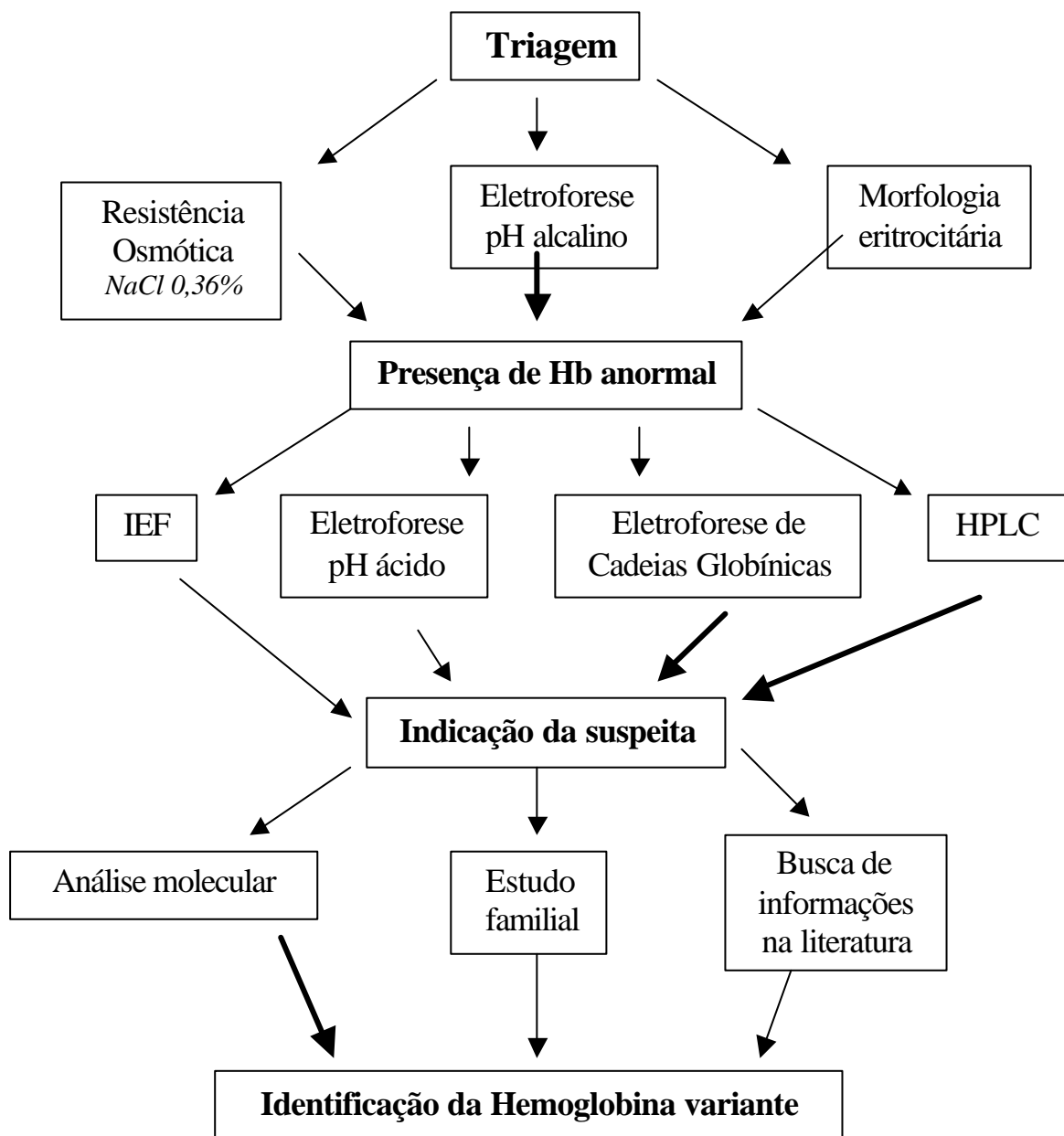


Figura 3: Fluxograma proposto para a análise de variantes de hemoglobinas.

### III. Protocolos das técnicas utilizadas

#### III.1. Preparação de hemolisados (Naoum, 1990 - com modificações)

Para que as amostras sejam submetidas a procedimentos eletroforéticos e testes bioquímicos, é necessário lisar as células para a obtenção da solução de hemoglobinas, que pode ser feito por:

Hemolisado Rápido (com saponina);

Solução de Hemoglobinas (com clorofórmio).

#### **Hemolisado Rápido (com saponina)**

*Equipamentos:*

Placa de Kline;

**Micropipetas;**

Bastão Plástico.

*Reagentes:*

-Saponina para análise	1 g
-Água destilada q.s.p.	100 mL

*Procedimento:*

1. Pipetar 100 µL de sangue e depositar em um dos compartimentos de uma placa de Kline;
2. Pipetar a mesma quantidade de reativo hemolisante (saponina 1%);
3. Homogeneizar com auxílio de um bastão plástico;
4. A homogeneização deve se processar até a hemólise completa da mistura. Utilizar o hemolisado após 5 minutos, e no máximo 24 horas depois da sua preparação.

## **Solução de Hemoglobinas**

### *Equipamentos:*

Tubos de ensaio;

Micropipetas;

Pipetas Pasteur.

### *Reagentes:*

-Solução salina 0,85%

-Clorofórmio

-Água destilada

### *Procedimento:*

1. Misturar 1 mL de sangue total com 1 mL de solução salina. Inverter e centrifugar por 5 minutos;
2. Remover o plasma e adicionar solução fisiológica ao restante de sangue, na proporção 1:1;
3. Centrifugar e descartar o sobrenadante. Repetir as etapas 2 e 3 por 2 ou 3 vezes;
4. Adicionar ao volume de eritrócitos lavados, igual volume de água destilada;
5. Homogeneizar, e a seguir adicionar um volume de clorofórmio, idêntico ao do hemolisado formado;
6. Agitar vigorosamente e centrifugar a 2.000 rpm, por 15 minutos;
7. Retirar, por meio de pipeta Pasteur, e transferir para um frasco limpo, a solução de hemoglobina sobrenadante (hemolisado).

### III.2. Resistência Globular Osmótica em Cloreto de Sódio a 0,36% (Silvestroni e Bianco, 1975)

#### *Equipamentos:*

Tubos de ensaio;

Micropipetas;

Folha branca com linhas negras.

#### *Reagentes:*

1. Solução estoque - NaCl a 10% - pH 7,4

-NaCl 9,0 g

-Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,36 g

-NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> . H<sub>2</sub>O 0,28 g

-Água destilada q.s.p. 100 mL

2.Solução trabalho

-NaCl 10% 36 mL

-Água destilada q.s.p. 1000 mL

#### *Procedimento:*

1. Em tubo de hemólise, colocar 1,5 mL de solução de NaCl a 0,36% e 10 µL de sangue total;
2. Agitar por inversão, suavemente e aguardar 10 minutos para leitura;
3. Colocar o tubo de hemólise com a amostra na solução de NaCl a 0,36% a 2,0 cm de distância de uma folha branca com linhas negras.

#### *Interpretação:*

A resistência aumentada à hemólise do eritrócito torna a amostra opaca e não visualiza-se as linhas negras. É interpretado como resultado positivo ao teste. Em

amostras com resistência normal à hemólise visualiza-se facilmente as linhas através da solução. Submeter as amostras com resistência aumentada a exames posteriores para o diagnóstico da talassemia beta heterozigota.

### **III.3. Análise, à Fresco, da Morfologia Eritrocitária (Bonini-Domingos, 1993)**

#### *Equipamentos:*

Lâminas para microscopia;

Microscópio óptico.

#### *Procedimento:*

1. Fazer o esfregaço sanguíneo e analisar ao microscópio óptico.

#### *Interpretação:*

Os resultados devem ser divulgados da seguinte maneira, segundo preconizado para as análises globais no Laboratório de Hemoglobinas e Genética das Doenças Hematológicas (LHGDH):

- células normais: (-) ou (N);
- alterações discretas: (+);
- alterações moderadas: (++);
- alterações acentuadas: (+++);
- alterações intermediárias: (N/+), (+/++), (++/+++).

### III.4. Eletroforese em acetato de celulose, pH Alcalino (Marengo-Rowe, 1965)

#### *Equipamentos:*

Cuba de eletroforese e fonte geradora de voltagem;

Tiras de acetato de celulose;

Papel absorvente e aplicador de amostras.

#### *Reagentes:*

##### *1. Tampão Tris-EDTA-Borato (TEB), pH 8,5*

-Tris hidroximetilaminometano	10,2 g
-Ácido etilenodiaminotetracético	0,6 g
-Ácido bórico	3,2 g
-Água destilada q.s.p.	1000 mL

##### *2. Corantes:*

###### *2.1. 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

###### *2.2. Ponceau*

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

##### *3. Solução descorante de ácido acético*

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

*Procedimento:*

1. Colocar igual quantidade de solução tampão em cada compartimento da cuba de eletroforese;
2. Embeber as fitas de acetato de celulose por 15 minutos no mínimo, em tampão TEB pH 8,5;
3. Secar as fitas entre duas folhas de papel absorvente e colocá-las na cuba de eletroforese, conectando-as com os compartimentos eletrolíticos através de tiras de papel mata-borrão;
4. Aplicar as amostras de hemoglobinas a 1,0 cm da extremidade da fita que está em contato com o pólo negativo;
5. Passar 300 volts por 40 minutos;
6. Analisar as frações sem coloração e posteriormente corar com Negro de amido ou Ponceau, embebendo as fitas em um dos corantes por 3-5 minutos;
7. Transferir as tiras para um recipiente que contenha solução descorante, agitando cuidadosamente entre 3 a 5 minutos, trocar a solução descorante usada por outra nova, deixando as tiras embebidas nesta solução o tempo necessário para clareá-las.

*Interpretação:*

A eletroforese alcalina em acetato de celulose permite a separação de hemoglobinas normais e grande parte das anormais. Durante a eletroforese é importante o uso de pelo menos uma amostra controle. Na ausência de padrões com Hb AS, AC, utiliza-se a Hb AA (normal). O padrão normal constitui-se em um excelente meio de comparações entre hemoglobinas “normais” e “anormais”. Para o resultado final, consultar o mapa de perfil eletroforético com o traçado de migrações específicas de hemoglobinas normais e anormais (figuras 4 e 5).

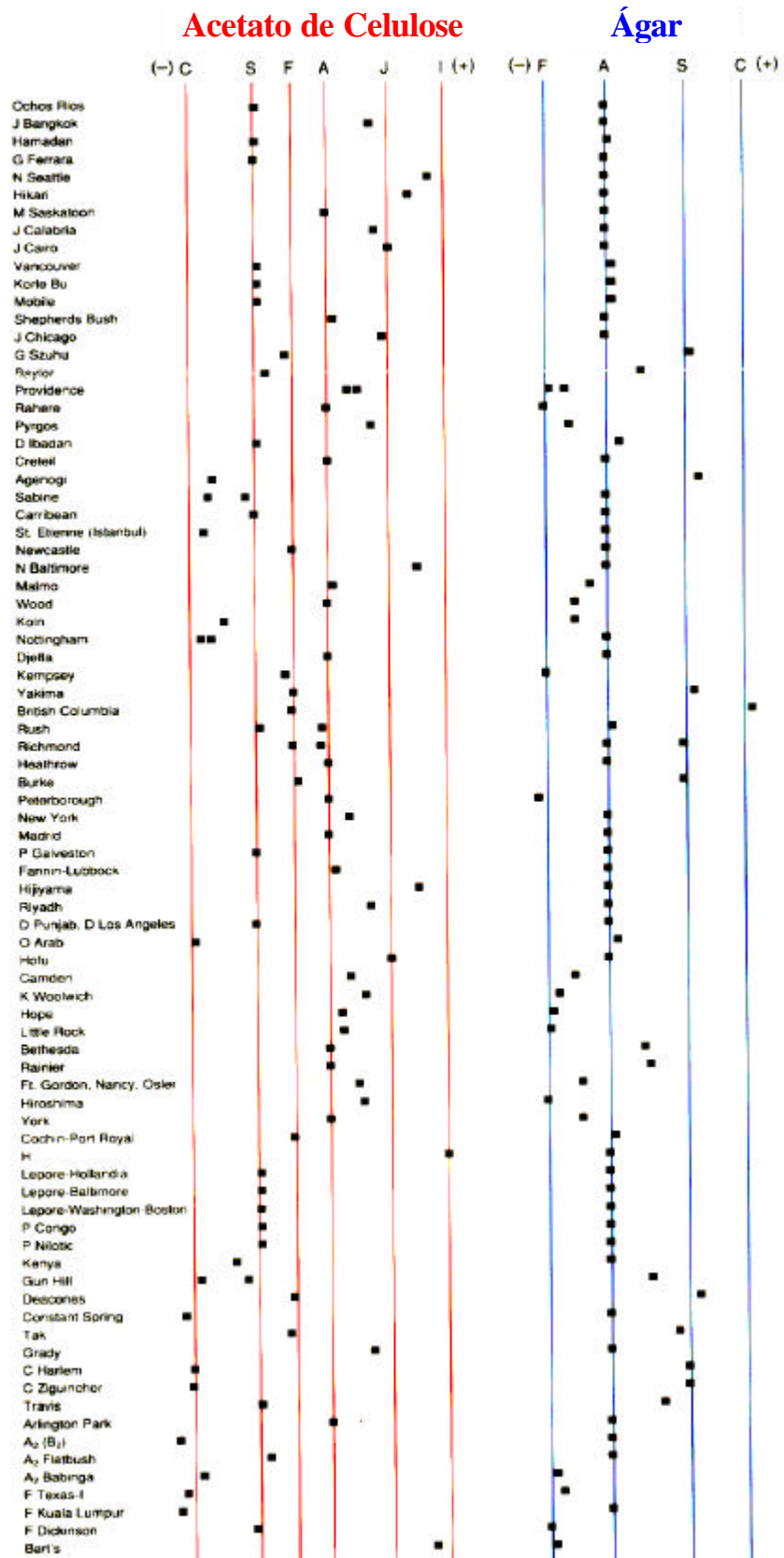


Figura 4: Disposição da mobilidade eletroforética de algumas hemoglobinas variantes em pH alcalino e pH ácido (Helena Laboratories).

Acetato de Celulose

Ágar

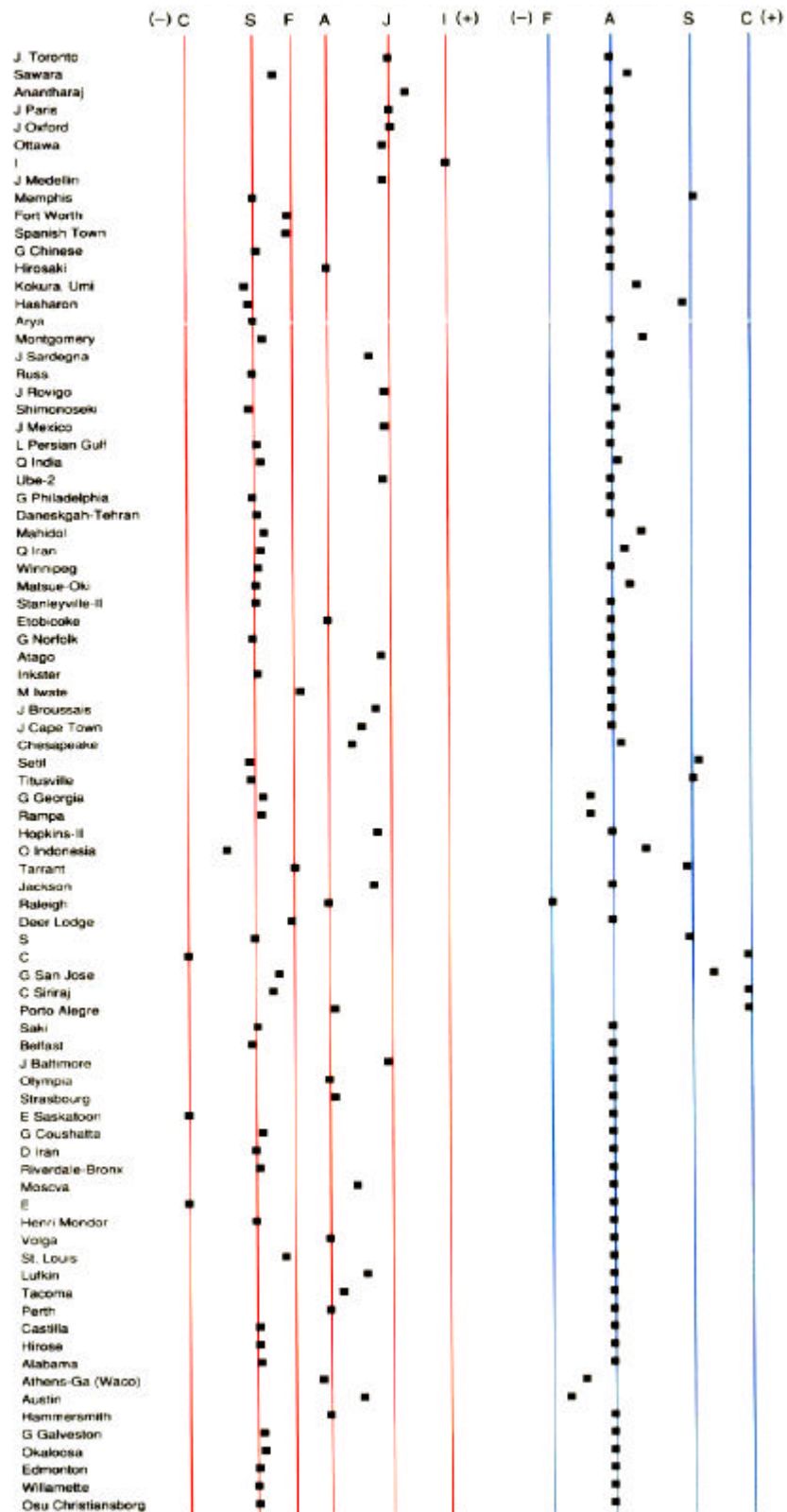


Figura 5: Disposição da mobilidade eletroforética de algumas hemoglobinas variantes em pH alcalino e pH ácido (Helena Laboratories).

*Transparentização do Acetato de Celulose:*

A transparentização da fita de acetato de celulose é utilizada para documentação e envio de resultado eletroforético ao solicitante. Esta técnica consiste em mergulhar as tiras de acetato de celulose descoradas e clareadas em metanol puro por no máximo 1 minuto; remover as tira para uma vasilha contendo ácido acético, metanol e glicerina, na proporção 14:85:1, respectivamente, deixando no mínimo, por 1 minuto; colocar as tiras bem esticadas em superfície de vidro, expondo-as sob luz infravermelha, a uma distância entre 5 e 10 cm, até total transparentização ou em estufa a 65°C, por 5 a 10 minutos.

### III.5. Eletroforese de Diferenciação em Ágar-Fosfato, pH 6,2 (Vella, 1968)

#### *Equipamentos:*

Cuba de eletroforese e fonte geradora de voltagem;

Papel de filtro;

Aplicador de amostras;

Erlenmeyer de 200 a 250 mL;

Lâminas de microscópio;

Pipetas de 10 mL.

#### *Reagentes:*

1. Tampão Fosfato pH 6,2

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2,02 g

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> .H<sub>2</sub>O 7,66 g

Água destilada q.s.p. 1000 mL

Obs: Para uso nos compartimentos eletrolíticos e confecção do gel.

2. Gel de Ágar-Fosfato

Ágar (Oxoid) 500 mg

Tampão fosfato pH 6,2 20 mL

3. Solução descorante – mesma usada para eletroforese alcalina

#### *Procedimento:*

1. Em um erlenmeyer de 250 mL, colocar 500 mg de ágar e dissolver em 20 mL de tampão fosfato, aquecer os componentes do gel de ágar-fosfato agitando rotatoriamente a cada 10 segundos até sua completa dissolução;

2. Pipetar 3,5 mL do gel liquefeito em lâminas de microscópio. Esse processo deve ser feito cuidadosamente colocando a pipeta verticalmente na porção média da

lâmina, e deixar com que o gel escoe lentamente por toda a extensão da lâmina.

Deixar gelificar à temperatura ambiente;

3. Para conexão do gel com os compartimentos eletrolíticos contendo tampão fosfato pH 6,2, usar folha dupla de papel de filtro;

4. Passar 100 volts por 20 minutos;

5. Analisar inicialmente sem corar;

6. Para melhor interpretação das frações corar com Ponceau ou Negro de Amido;

7. Descorar com solução descorante até obter o resultado desejado.

*Interpretação:*

A interpretação da migração eletroforética dos diferentes tipos de hemoglobina é realizada através de comparações com mapas específicos (figuras 4 e 5). Este procedimento eletroforético pode também ser realizado com gel de agarose como suporte (CELM).

### III.6. Eletroforese em Acetato de Celulose em pH Neutro (Dacie e Lewis, 1985)

#### *Equipamentos:*

Cuba de eletroforese e fonte geradora de voltagem;

Tiras de acetato de celulose;

Papel absorvente e aplicador de amostras.

#### *Reagentes:*

$\text{KH}_2\text{PO}_4$	3,11 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	1,66 g
Água destilada q.s.p.	1000 mL

#### *Procedimento:*

1. Embeber as fitas de acetato de celulose por 15 minutos, no mínimo, em tampão pH neutro. Colocar o mesmo tampão nos compartimentos eletrolíticos da cuba de eletroforese;
2. Secar as fitas entre duas folhas de papel absorvente e colocá-las na cuba de eletroforese conectando-as com os compartimentos eletrolíticos através de tiras de papel mata borrão;
3. Aplicar as amostras de hemoglobina a 1,0 cm da extremidade da fita que está em contato com o pólo negativo;
4. Passar 300 volts por 30 minutos;
5. Analisar as frações sem coloração.

#### *Interpretação:*

Consultar mapas de traçados eletroforéticos.

### III.7. Pesquisa de Corpos de Heinz e Agregados de Hemoglobina H (Papayannopoulos e Stamatayannopoulos, 1974)

#### *Equipamentos:*

Microscópio com lente de imersão;

Tubos de ensaio de 12 x 75 mm;

Lâminas;

Banho-maria à 37°C;

Micropipetas de 50 µL e 100 µL.

#### *Reagentes:*

##### 1.Solução salina

Cloreto de sódio 0,85 g

Água destilada q.s.p. 100 mL

##### 2.Solução citrato

Citrato de sódio 2,2 g

Água destilada q.s.p. 100 mL

##### 3.Solução de azul cresil brilhante

Azul cresil brilhante 1,0 g

Solução salina 100 mL

Solução citrato 25 mL

#### *Procedimento:*

1. Colocar 50 µL de sangue total em tubo de ensaio pequeno e adicionar 100µL de solução de azul cresil brilhante. Agitar o tubo suavemente;

2. Incubar o material a 37°C fazendo-se esfregaços finos com 30 minutos, 1 hora e 2 horas de incubação, para a observação dos corpos de Heinz e Agregados de Hemoglobina H ao microscópio em objetiva de imersão.

*Interpretação:*

A presença de hemoglobina H nos eritrócitos aparece como fina granulação distribuída homoganeamente. Os corpos de Heinz são facilmente observados nos casos de hemoglobinas instáveis.

### III.8. Eletroforese por Focalização Isoelétrica em Gel de Agarose (Naoum, 1999)

#### *Reagentes:*

1. Solução de ácido fosfórico (ânodo) (1M)

Ácido fosfórico	3,8 mL
Água bidestilada q.s.p.	50 mL

2. Solução de hidróxido de sódio (cátodo) (1M)

NaOH	4 g
Água bidestilada q.s.p.	100 mL

3. Anfolinas

Anfolina	pH 5-8
Anfolina	pH 3-10

4. Agarose I.E.F (Pharmacia Fine Chemicals for isoelectric focusing)

#### *Preparação do gel de agarose:*

1. Pesar 22 mg de agarose em um erlenmeyer de 25 ou 50 mL;
2. Adicionar 13,2 mL de água bidestilada;
3. Colocar o erlenmeyer dentro de um becker de 100 mL com água em ebulição - o fundo do becker deve ter sua superfície preenchida com rolhas de borracha - e observar constantemente o desenvolvimento da dissolução da agarose, que ocorrerá entre 5 e 10 minutos;
4. Formado o gel, retira-se o erlenmeyer do becker e adiciona-se as anfolinas nas seguintes proporções: 0,6 mL de anfolina com pH 5-8; 0,4 mL de anfolina com pH 3-10. A adição das anfolinas é necessária para a formação do gradiente de pH;
5. Colocar o gel, rapidamente, na placa de vidro (5 x 7 cm) que suportará um volume de 5 mL do gel de agarose. O restante do gel poderá ser solidificado no erlenmeyer ou utilizado em outra lâmina para eletroforese adicional.

Enquanto o gel se solidifica na lâmina, os hemolisados a serem testados deverão ser preparados.

*Preparação do hemolisado:*

O hemolisado deve ser feito com sangue recente. Os eritrócitos dos sangues a serem testados devem ser lavados por 3 vezes com solução de NaCl 0,85% e, ao volume de eritrócitos lavados, adicionam-se 3 a 5 volumes de água. A solução de hemolisados assim preparada proporcionará uma concentração de hemoglobina próxima de 5 g/dL.

*Pré-focalização*

1. Na extremidade catódica da lâmina, coloca-se uma tira de papel de filtro medindo 5 x 0,5 cm, com 1 mm de espessura. Esta tira deve estar previamente embebida com a solução de hidróxido de sódio.
2. Na extremidade anódica da lâmina, coloca-se outra tira, com as mesmas dimensões, embebida com a solução de ácido fosfórico.
3. Aplica-se uma corrente de 5 mA por 10 minutos, para que se forme o gradiente de pH.
4. Após este período, desconectam-se os eletrodos para que se processe a aplicação da amostra.

*Aplicação da amostra:*

A aplicação da amostra é feita embebendo-se pequenas tiras de papel de filtro com 1mm de espessura, medindo 3 x 5 mm, cada uma. Em geral, cada lâmina de agarose, nas medidas citadas, comporta seis aplicações, distanciadas 5mm umas das outras. Os papéis de filtro são embebidos com os hemolisados, com cuidado para que não apresentem excesso de amostra. Os papéis de filtro podem ser interligados um ao outro por meio de fita adesiva, facilitando sua aplicação no gel.

*Focalização:*

1. Aplica-se uma corrente de 5 mA até que as amostras se transfiram dos papéis de filtro para o gel e iniciem suas migrações.
2. Após a transferência, a corrente é elevada para 8 mA e os papéis de filtro, que foram utilizados para as amostras, são retirados. O tempo de corrida é variável, durando em média 40 minutos. Entretanto, o acompanhamento visual do fracionamento é que permitirá adequar melhor o tempo de corrida.

*Fixação, secagem e coloração:*

As lâminas de agarose devem ser fixadas com ácido tricloroacético (TCA) a 10%. Adicionando-se 10 mL desta solução sobre a agarose, deixando por 3 minutos. A seguir, despreza-se o TCA e a lâmina é lavada com água destilada por 1 a 2 minutos. Para a secagem da agarose, envolve-se a lâmina com um papel de filtro umedecido com água destilada e deixa-se por 12 a 15 horas à temperatura ambiente, tempo necessário para a desidratação da agarose. A coloração se faz com Ponceau, Negro de amido ou qualquer corante de proteínas, por 6 horas. Após esse tempo, a lâmina é removida para uma vasilha contendo água destilada. O tempo de descoloração é variável e são necessárias várias trocas de água.

*Interpretação:*

Após o fracionamento é possível visualizar, numa amostra normal, as hemoglobinas A, A<sub>2</sub> e A<sub>1c</sub>, esta última com migração mais rápida que a hemoglobina A. A resolução é superior aos métodos convencionais, permitindo a separação de meta-hemoglobina A, sulfo-hemoglobina A, entre outras.

### **III.9. Eletroforese de Cadeias Polipeptídicas, pH Alcalino, em Acetato de Celulose (Schneider, 1974 - com modificações)**

#### *Equipamentos:*

Cuba de eletroforese;

Fonte geradora de voltagem;

Tiras de Acetato de celulose;

Papel absorvente;

Tubos 12 x 75 mm;

Microaplicador de amostras;

Becker de 500 mL;

Agitador magnético.

#### *Reagentes:*

1. Tampão Tris-EDTA-Borato (TEB) pH 8,5
2. Solução corante Ponceau ou Negro de Amido
3. Solução descorante
4. Uréia
5. 2-mercaptoetanol

#### *Procedimento:*

1. No dia anterior ao teste preparar o tampão trabalho, misturando, em um becker, 36 g de uréia e 70 mL de tampão Tris-EDTA-Borato pH 8,5 (Tampão Tris-uréia). Homogeneizar a solução em um agitador magnético, por no mínimo 12 horas, até o momento de uso, à temperatura ambiente;
2. Misturar em um pequeno tubo 50  $\mu$ L do tampão Tris-uréia, 50  $\mu$ L de 2-mercaptoetanol e 50  $\mu$ L de hemolisado com clorofórmio. Deixar em repouso por 1 hora à temperatura ambiente;

3. Adicionar 6,4 mL de 2-mercaptoetanol ao tampão Tris-uréia, misturar bem e colocar a solução tampão Tris-uréia-mercaptoetanol nos compartimentos eletrolíticos. Embeber o acetato de celulose durante 60 minutos;
4. Retirar o excesso de solução tampão do acetato de celulose entre duas folhas de papel filtro e colocá-lo na cuba de eletroforese;
5. Conectar a fita de acetato de celulose aos compartimentos eletrolíticos através de tiras de papel de filtro;
6. Aplicar as amostras na porção média do acetato;
7. Passar 110 volts por 40 minutos e 220 volts por 15 minutos;
8. Corar as fitas com solução corante Ponceau, ou Negro de amido ou outro corante de proteínas por 3-5 minutos;
9. Descorar com solução descorante.

*Controle:*

É importante realizar esse procedimento comparando com amostras que apresentem cadeias polipeptídicas de hemoglobina normal e hemoglobinas variantes conhecidas, como por exemplo Hb AS ou Hb AC.

*Interpretação:*

O mapa de disposição de cadeias polipeptídicas, facilita a interpretação dos tipos mais frequentes de hemoglobinas variantes (figura 6).

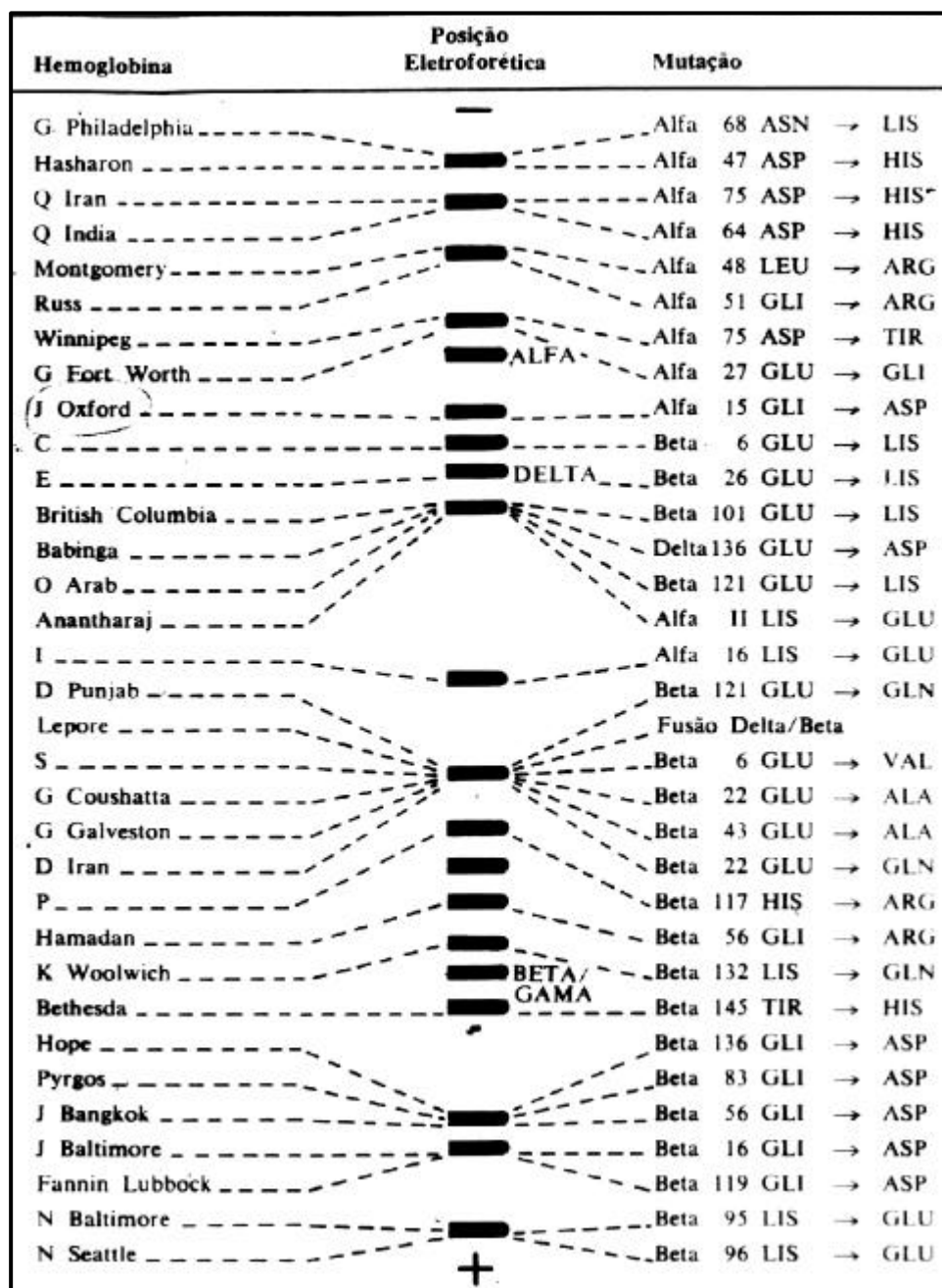


Figura 6: Disposição eletroforética das cadeias polipeptídicas de 33 hemoglobinas variantes em eletroforese de acetato de celulose, pH alcalino. Mobilidades estimadas em comparação com as cadeias alfa, beta, gama e delta normais (Naoum, 1997).

### III.10. Cromatografia Líquida de Alta Pressão (HPLC)

O equipamento VARIANT é um sistema fechado de cromatografia líquida de alta pressão totalmente automatizado. Funciona com kit de análise específicos para a detecção de talassemia beta heterozigota (BTS). Ele é utilizado para separar e determinar as porcentagens para as Hb A<sub>2</sub> e F e fornecer dados qualitativos de hemoglobinas anormais. As variantes mais comuns incluem as Hb D, S, C e E. A identificação dessas variantes é feita usando-se o tempo de retenção das respectivas janelas, como “janela-D”, “janela-S” e “janela-C”. A Hb E é eluída dentro da janela de Hb A<sub>2</sub>.

Antes de iniciar a análise das amostras, o próprio aparelho faz uma limpeza da coluna cromatográfica e sua calibração, por calibradores com base em amostras de Hb A<sub>2</sub> e Hb F. Após a diluição das amostras a serem analisadas e a introdução destas no aparelho, um sistema de duas bombas de êmbolo duplo injeta uma mistura de tampões de diluição com controles de gradientes pré programados, passam através da coluna de troca iônica. A força iônica da mistura dos dois tampões aumentada gradativamente pela maior contribuição do tampão 2, retendo as amostras de hemoglobinas na coluna, por meio de sua especificidade de cargas. A absorbância é medida no comprimento de onda de 415 nm. Um segundo filtro de 690 nm corrige a linha de base que pode apresentar alterações provocadas pela mistura de tampões com diferentes forças iônicas. As mudanças na absorbância são monitoradas e exibidas como um cromatograma de absorbância x tempo. Os dados da 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 da injeção da amostra até o ápice do pico de hemoglobina, sendo característico para cada hemoglobina. Ao final da análise, uma cópia do cromatograma e dos dados do relatório de cada amostra são impressos automaticamente.

*Equipamentos:*

Eppendorffs

Micropipetas e ponteiras;

*Procedimento:*

1. Diluir 5mL de sangue da amostra a ser analisada em 1mL de reagente de hemólise fornecido pelo Kit BTS.
2. Introduzir as amostras na placa leitora do aparelho.
3. Aguardar a impressão dos cromatogramas após a análise.

### III.11. Extração de DNA de Glóbulos Brancos (Pena et al., 1991 – com modificações)

#### *Equipamentos:*

Tubos de 15 mL estéreis;

Pipetas;

Pipetadores;

Micropipetas e ponteiras;

Banho-maria;

Centrífuga.

#### *Reagentes:*

##### 1. Solução de lise 1 para extração de DNA (lise de células vermelhas)

Sacarose 0,32M 10,95 g

Tris HCl 10 mM 1 mL

MgCl<sub>2</sub> 5 mM 0,5 mL

Triton 1% 100x 1 mL

Água mili-Q autoclavada q.s.p. 100 mL

Dissolver bem e armazenar em geladeira.

##### 2. Solução de lise 2 para extração de DNA (lise de células brancas)

0,075 M de NaCl 2,19 g

0,02 M de EDTA (solução estoque pH 8,0) 20 mL

Água mili-Q autoclavada q.s.p. 500 mL

Armazenar em geladeira.

##### 3. Proteinase K (20 mg/mL)

Proteinase K 20 mg

Água mili-Q q.s.p. 1 mL

Conservar em freezer.

## 4. Clorofórmio/ álcool isoamílico 24:1 (preparado no momento do uso)

Clorofórmio	24 mL
Álcool isoamílico	1 mL

## 5. SDS 20%

SDS	20 g
Água mili-Q autoclavada q.s.p.	100 mL

O SDS deve ser colocado aos poucos. Não autoclavar e estocar à temperatura ambiente.

## 6. Etanol 70%

## 7. KCl 2M

KCl	14,91 g
Água mili-Q autoclavada q.s.p.	100 mL

*Procedimento:*

1. Colocar 3 mL de sangue periférico, colhido com EDTA, em tubo de polipropileno e completar o volume para 10 mL com solução de lise 1;
2. Deixar descansar por 15 minutos e centrifugar 20 minutos a 2700 rpm;
3. Desprezar o sobrenadante;
4. Acrescentar ao sedimento ou *pellet* 4,5 mL de solução de lise 2, agitar no vórtex, adicionar 250 µL de SDS à 10% e 50 µL de proteinase K 20 mg/mL e homogeneizar;
5. Manter em banho-maria a 37°C durante a noite ou 42°C por 3 horas;
6. Adicionar 5 mL de fenol e homogeneizar;
7. Centrifugar 20 minutos a 2700 rpm;
8. Transferir a fase superior para outro tubo e adicionar 5 mL de clorofórmio : álcool isoamílico (24:1);
9. Homogeneizar e centrifugar por 20 minutos a 2700 rpm;

10. Transferir a fase superior para outro tubo e adicionar novamente 5 mL de clorofórmio:álcool isoamílico e homogeneizar (Repetição do procedimento anterior);
11. Centrifugar 20 minutos a 2700 rpm;
12. Colocar 500  $\mu$ L de solução de KCl 2M (gelada) num tubo e transferir o sobrenadante do outro tubo para este e adicionar etanol 100% (bem gelado) até completar 12 mL. Inverter o tubo várias vezes até precipitar o DNA;
13. Centrifugar 20 minutos a 2700 rpm;
14. Desprezar o sobrenadante e lavar o DNA, que ficou aderido ao tubo, com etanol 70% (gelado) e deixar secar por 15 minutos;
15. Colocar 100  $\mu$ L de TE ou água Mili-Q (tampão de diluição sem detergente, somente Tris-EDTA) e manter em banho-maria a 37°C por 24 horas, para total solubilização do DNA;
16. Conservar em freezer à -20°C.

### III.12. Extração de DNA de Glóbulos Brancos utilizando o mDx<sup>®</sup> InstaGene<sup>™</sup> Whole Blood Kit (BIO-RAD)

#### *Equipamentos:*

Eppendorffs de 1,5 mL;

Ponteiras descartáveis;

Micropipetas de 20-200 µL e de 100-1000 µL;

Microcentrifuga;

Banho-maria à 70°C;

Banho-maria à 95°C;

Vórtex;

Placa agitadora magnética;

#### *Reagentes:*

Tampão de lise	200 mL
Matriz InstaGene	20 mL

#### *Procedimento:*

1. Ajustar os banhos -maria à 70°C e 95°C;
2. Em tubo de 1,5 mL, misturar 50 µL de sangue com 1 mL de tampão de lise. Tampar o tubo e agitar por inversão. Deixar à temperatura ambiente por 8 minutos, invertendo de vez em quando;
3. Centrifugar o tubo à 10.000-12.000 rpm por 1 minuto;
4. Observar o *pellet* no fundo do tubo. Remover o sobrenadante com ponteira descartável depositando a ponta da ponteira na parede do tubo do lado oposto ao *pellet*. Descartar a ponteira e o sobrenadante;
5. Adicionar 0,5 mL de tampão de lise ao *pellet*. Agitar no vórtex por 10 segundos. Centrifugar por 1 minuto. O *pellet* deve estar mais visível nessa etapa. Aspirar o sobrenadante sem movimentar o *pellet*;

6. Repetir a etapa número 5. Ao final, o *pellet* deve estar branco;
7. Colocar o frasco da matriz em uma placa agitadora. Ligar em velocidade moderada por 30 segundos para obter uma suspensão uniforme. Remover 200  $\mu\text{L}$  do frasco e adicionar ao tubo contendo o *pellet*. NÃO agitar no vórtex nessa etapa. Tampar o tubo e incubar à 70°C por 8 minutos;
8. Levar ao vórtex por 10 segundos. Transferir o tubo para o banho à 95°C e incubar por 4 minutos;
9. Levar ao vórtex por 10 segundos. Centrifugar por 1 minuto. Utilizar o sobrenadante para o PCR (5-10  $\mu\text{L}$  de sobrenadante para 50  $\mu\text{L}$  de reação). Não pipetar a matriz, quando for transferir o sobrenadante para o tubo de amplificação. Se a amplificação não for feita imediatamente, estocar o tubo do passo 9 à -20°C. Antes de realizar a reação de amplificação, descongelar o tubo à temperatura ambiente e repetir o passo 9.

### III. 13. Protocolo para extração de DNA de glóbulos brancos utilizando o mDx<sup>®</sup> InstaGene<sup>™</sup> Genomic DNA Kit (BIO-RAD)

#### *Equipamentos:*

Eppendorffs de 1,5 mL;

Ponteiras descartáveis;

Micropipetas de 20-200  $\mu$ L e de 100-1000  $\mu$ L;

Microcentrifuga;

Vórtex.

#### *Reagentes:*

Tampão de lise 1	2100 $\mu$ L
Tampão de lise 2	15 $\mu$ L
Solução de precipitação de proteínas	200 $\mu$ L
Etanol 95%	400 $\mu$ L
Etanol 70%	500 $\mu$ L
Solução de reidratação	20-200 $\mu$ L

#### *Procedimento:*

1. Colocar 900  $\mu$ L do solução de lise 1 em um eppendorff de 1,5 mL estéril;
2. Adicionar 300  $\mu$ L de sangue total. Tampar o tubo e agitar por inversão por 10-15 vezes;
3. Centrifugar à 13.000-15.000 rpm por 20 segundos. Descartar o sobrenadante sem agitar o *pellet*;
4. Lavar o *pellet* de células brancas adicionando 500  $\mu$ L de solução de lise 1. Agitar pipetando o *pellet* para cima e para baixo até ressuspendê-lo completamente. Centrifugar o tubo à 13.000-15.000 rpm por 20 segundos. Descartar o sobrenadante sem agitar o *pellet*. Repetir esse procedimento;

5. Ressuspender o *pellet* de células brancas adicionando 200  $\mu\text{L}$  de solução de lise 1. Agitar pipetando o *pellet* para cima e para baixo até ressuspendê-lo completamente. O *pellet* deve estar completamente ressuspendido antes do passo seguinte;
6. Adicionar 15  $\mu\text{L}$  de solução de lise 2. Pipetar para cima e para baixo e levar ao vórtex por alguns segundos;
7. Adicionar 200  $\mu\text{L}$  de solução de precipitação de proteínas e levar ao vórtex por 10-20 segundos. Centrifugar à 13.000-15.000 rpm por 3 minutos para precipitar as proteínas;
8. Transferir o sobrenadante para um novo eppendorff e adicionar 400  $\mu\text{L}$  de etanol 95% para precipitar o DNA. Inverter 10-20 vezes para observar o DNA;
9. Centrifugar à 13.000-15.000 rpm por 20 segundos. O DNA será visível como um *pellet* branco. Descartar o sobrenadante cuidadosamente, sem agitar o *pellet*;
10. Adicionar 500  $\mu\text{L}$  de etanol 70% e inverter por 5-10 vezes para lavar o DNA. Centrifugar à 13.000-15.000 rpm por 20 segundos. Descartar o sobrenadante cuidadosamente, sem agitar o *pellet*;
11. Inverter o tubo sobre papel absorvente para remoção do restante do etanol. Deixar secar por 5-10 minutos;
12. Adicionar 20-200  $\mu\text{L}$  de solução de reidratação de DNA. Para a completa reidratação é necessária a incubação durante a noite em temperatura ambiente;
13. Conservar o DNA à 2-8° C.

#### *Quantificação do DNA*

Para checar a quantidade e qualidade do DNA, fazer uma alíquota de 5  $\mu\text{L}$  de DNA + 395  $\mu\text{L}$  de H<sub>2</sub>O milli-Q autoclavada. A concentração e a pureza do material obtido é fornecida pelo espectrofotômetro. A concentração do DNA é dada pela determinação da absorbância à 260 nm.

### III.14. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

#### Para identificação da Hb D- Los Angeles

*Equipamentos:*

Eppendorffs;

Micropipetas e ponteiras;

Termociclador;

Amplificação do éxon 3 do gene da beta globina

Utilizar os seguintes iniciadores ou *primers*:

**Primer sense:** CD1: 5' TGC CTC TTT GCA CCA TTC TA 3'.

**Primer anti-sense:** CD2: 5' TAG AAT GGT GCA AAG AGG CA 3'.

#### *Reação para o Éxon 3*

<b>Mix:</b>	Água	11,0 µL
	Tampão 10X	2,5 µL
	dNTP	2,0 µL
	MgCl	2,5 µL
	<i>Primer</i> CD1	2,5 µL
	<i>Primer</i> CD2	2,5 µL
	<i>Taq</i> DNA polimerase	1,0 µL
<b>DNA molde</b>	DNA	1,0 µL
<b>Total da reação</b>		25,0 µL

Etapas	Pré-Ciclo		Denaturação	Anelamento	Extensão	Extensão final	Refrigeração
Temperatura	94°C	53°C	94°C	53°C	72°C	72°C	4°C
Duração	5'	2'	30''	30''	1'	10'	¥
Ciclos	1	1	35	35	35	1	



*Preparação do gel:*

1. Em um becker adicionar 17,5 mL de água Milli-Q e 5 mL de poliacrilamida 40%;
2. Adicionar 2,5 mL de TEB 10%;
3. Acrescentar 100  $\mu$ L de persulfato de amônio 25% e 13  $\mu$ L de TEMED;
4. Aplicar nas placas previamente montadas para evitar que a solução de poliacrilamida polimerize antes de seu preenchimento;
5. Aguardar a polimerização do gel por no mínimo 1 hora;
6. Adicionar 4  $\mu$ L de azul de bromofenol ao produto da digestão e aplicá-los.

*Tampão de corrida:*

TEB 10x	100 mL
Água Milli-Q	900 mL

*Coloração do gel de poliacrilamida pela prata**Reagentes:*

Solução Fixadora	
Etanol	30 mL
Ácido Acético	2,25 mL
Água Milli-Q q.s.p.	300 mL
Solução de prata	
AgNO <sub>3</sub>	0,3 g
Água Milli-Q q.s.p.	150 mL
Solução Reveladora	
NaOH	4,5 g
Formaldeído	450 $\mu$ L
Água Milli-Q q.s.p.	150 mL

*Procedimento:*

1. Depositar o gel em um recipiente limpo contendo 150 mL do fixador;
2. Deixar por aproximadamente 10 minutos. Retirar o fixador;
3. Adicionar a solução de prata e agitar levemente por 15 minutos;
4. Lavar duas vezes o gel com água Milli-Q até a total retirada da prata;
5. Adicionar a solução reveladora cuidadosamente, sem deixar cair sobre o gel; agitar levemente e observar a coloração;
6. Lavar com água e adicionar novo fixador. Secar em papel celofane, segundo Ceron et al. (1992).

### Para identificação da Hb Hasharon

#### *Equipamentos:*

Eppendorffs;

Micropipetas e ponteiras;

Termociclador;

Amplificação do éxon 2 do gene da alfa globina

#### *Utilizados os seguintes primers:*

**Primer sense:** LH1: 5' AAG CCC TGG AGA GGT GAG 3'.

**Primer anti-sense:** Right: 5' GGA GCT GTG CAG AGA AGA GG 3'.

#### *Reação para o Éxon 2*

<b>Mix:</b>	Água	13,3 µL
	Tampão 10X	2,5 µL
	dNTP	2,0 µL
	MgCl	2,5 µL
	<i>Primer</i> LH1	1,25 µL
	<i>Primer</i> Right	1,25 µL
	<i>Taq</i> DNA polimerase	0,2 µL
<b>DNA molde</b>	DNA	2,0 µL
<b>Total da reação</b>		25,0 µL

Étapas	Pré-Ciclo	Denaturação	Anelamento	Extensão	Extensão final	Refrigeração
Temperatura	95°C	95°C	63°C	72° C	72°C	4°C
Duração	5'	45''	1'	1'	10'	∞
Ciclos	1	30	30	30	1	

**Digestão enzimática com *Taq*I***Reagentes:*

Para cada amostra deve-se adicionar em eppendorff:

Tampão 1x	10,0 µL
BSA	0,25 µL
Enzima	0,5 µL
Produto da PCR	10,0 µL

Manter em 65°C durante a noite.

A enzima *Taq*I (BioLabs ®) digere a seguinte sequência:

5'- T ↓ CGA - 3'

3'- AGC ↑ T - 5'

Os fragmentos podem ser analisados em gel de agarose 1,5%.

### **III.15. Hibridação de oligonucleotídeos alelo específicos (ASO)**

Sob condições ideais, os oligonucleotídeos alelo-específicos (ASO) sintéticos hibridam com o DNA alvo formando um dúplex apenas se suas bases forem perfeitamente complementares. A existência de uma única base que não esteja pareada, ou pareada erroneamente no dúplex reduz sua estabilidade e conseqüentemente a hibridação. O teste pode ser dividido em 3 fases: fase de preparação, amplificação do DNA alvo e detecção por hibridação da sonda alelo-específica com o produto amplificado.

A fase de preparação consiste na extração de DNA do paciente a ser analisado. Após esse passo, o DNA é amplificado em uma reação de PCR contendo *primers* marcados com biotina, específicos para o gene de interesse. Para a correta detecção é necessária a montagem da placa de análise, composta por fitas de diferentes cores e da fita para o controle do teste. Posteriormente, uma alíquota do produto amplificado é denaturada e adicionada aos poços que contêm os oligonucleotídeos específicos para o alelo normal e para o alelo mutante. Os oligonucleotídeos do alelo normal são fixados em poços de uma determinada cor enquanto os oligonucleotídeos dos alelos mutantes em poços de cores diferentes do normal. Durante a hibridação, apenas o produto amplificado perfeitamente pareado com o oligonucleotídeo permanece no poço; o produto não pareado será eliminado através de lavagens com tampões específicos. Após os procedimentos de lavagem, adiciona-se o conjugado estreptoavidina peroxidase (SA-HRP), que se liga aos *primers* marcados com biotina. Após a lavagem final, o conjugado de estreptoavidina peroxidase é detectado pela reação colorimétrica produzida com a adição do substrato tetrametilbenzidina (TMB). A cor azul é então convertida à amarelo pela adição da solução de parada da reação. Deve-se então levar a placa de análise para a leitora. Posteriormente são realizados os cálculos específicos para determinação da presença ou não do alelo mutante.

### Diagnóstico de Hb S e Hb C utilizando o mDx<sup>®</sup> Variant Gene S & C (BIO-RAD)

#### *Equipamentos:*

Kit mDx<sup>®</sup> Variant Gene S & C;

Eppendorffs;

Micropipetas e ponteyras;

Lavadora;

Vórtex;

Microcentrífuga;

Incubadora;

Leitora.

#### *Amplificação:*

1. Remover o master mix de amplificação da geladeira e colocá-lo no gelo.

Acrescentar a *Taq* polimerase seguindo os valores abaixo:

(n+1)PCR	Master Mix	<i>Taq</i> Polimerase (mL)
4	160	1,6
5	200	2,0
6	240	2,4
7	280	2,8
8	320	3,2
9	360	3,6
10	400	4,0

2. Depois de pronto o mix de amplificação, levar ao vórtex por 5 segundos e centrífugar por 10 segundos. Colocar o mix no gelo;

3. Para sangue total: adicionar 40 µL de mix de reação no fundo do tubo contendo 10 µL de DNA. Evitar a formação de bolhas;

4. Colocar os tubos dentro do termociclador, seguindo os ciclos abaixo:

<b>Temperatura</b>	94°C	94°C	62°C	72°C	72°C
<b>Duração</b>	1'	45''	15'	30''	5'
<b>Ciclos</b>	1	35	35	35	1

*Hibridação:*

1. Remover as soluções de hibridação, denaturação, conjugado SA-HRP e substrato (TMB) do refrigerador. Deixar que aqueçam à temperatura ambiente;
2. Remover o controle do refrigerador e colocar no gelo;
3. Remover o número apropriado de fitas laranja (2 amostras de paciente por fita) e uma fita do controle vermelho da geladeira;
4. Preparar o Well Wash Buffer (WWB) misturando 100 mL do WWB 10x com 900 mL de água deionizada;
5. Lavar as fitas com o WWB para prepará-las para a reação de detecção (programa de reidratação na lavadora);
6. Adicionar 50 µL de água deionizada e 100 µL de solução denaturante em cada tudo de amostra. Levar ao vórtex e centrifugar por 3 segundos. Incubar em temperatura ambiente por 10 minutos;
7. Misturar 9 µL de controle de validação de ensaio, 36 µL de água deionizada e 45 µL de solução denaturante. Levar ao vórtex e centrifugar por 3 segundos. Incubar em temperatura ambiente por 10 minutos;
8. Pipetar 40 µL de solução de hibridação em cada poço na fita laranja e no controle vermelho;
9. Pipetar 10 µL de produto de PCR denaturado dentro de cada um dos quatro poços A-B-C-D ou E-F-G-H da fita laranja;

10. Pipetar 10  $\mu\text{L}$  de controle de validação do ensaio dentro de cada um dos oito poços da fita de controle vermelha;
11. Misturar bem os conteúdos com leves toques na placa;
12. Cobrir a placa com uma fita de vedação e incubar a  $37^{\circ}\text{C}$  por uma hora;
13. Depois da hibridação remover a fita de vedação e lavar a placa por 5 vezes (programa de lavagem).

#### *Deteção*

1. Adicionar 50  $\mu\text{L}$  do conjugado SA-HRP em cada poço das fitas das amostras e da fita controle. Cobrir a placa com fita de vedação e incubar a  $37^{\circ}\text{C}$  por 30 minutos;
2. Remover a fita de vedação e lavar a placa (programa de lavagem);
3. Adicionar 50  $\mu\text{L}$  de substrato (TMB) dentro de cada poço da fita de amostra e da fita controle. Incubar em temperatura ambiente por 10 minutos;
4. Acrescentar 50  $\mu\text{L}$  da solução de parada da reação (stop solution) dentro de cada poço da fita de amostra e da fita controle;
5. Imediatamente transferir a placa para a leitora de microplaca. A leitora capta a absorbância a 450 nm e 655 nm (absorbância de referência). O aparelho calcula a diferença entre as duas absorbâncias. Posteriormente esse valor será subtraído da média dos valores de absorbância encontrada nos poços controle. Os valores encontrados após esse cálculo são utilizados para análise.
6. Cálculos específicos são realizados para determinação da presença ou ausência do alelo testado.

### Diagnóstico de mutantes de Talassemia Beta utilizando os Kits mDx<sup>®</sup> BeTha Gene 1 e BeTha Gene 2 (BIO RAD)

Esses kits são compostos de sondas oligoespecíficas de DNA para determinação qualitativa para a presença das mutações do gene beta. São elas: - CD39, IVS1:110, IVS1:6, IVS1:1, IVS2:745, IVS2:1, -87, CD6-A (kit BeTha Gene 1) e -CD41-42, CD17, -28, IVS2:654, CD19, IVS1:5, CD71-72, HbE (kit BeTha Gene 2)

#### *Equipamentos:*

Kit mDx<sup>®</sup> BeTha Gene 1 e BeTha Gene 2;

Eppendorffs;

Micropipetas e ponteiras;

Lavadora;

Vórtex;

Microcentrífuga;

Incubadora;

Leitora.

#### *Amplificação:*

1. Remover o master mix de amplificação da geladeira e colocá-lo no gelo. Acrescentar a *Taq* polimerase seguindo os valores abaixo:

PCR	Master Mix (mL)	<i>Taq</i> Polimerase (U)
1	40	2
2	80	4
3	120	6
4	160	8
5	200	10
6	240	12
7	280	14
8	320	16
9	360	18
10	400	20

2. Depois de pronto o mix de amplificação, levar ao vórtex por 5 segundos e centrifugar por 10 segundos. Colocar o mix no gelo;
3. Adicionar 40  $\mu\text{L}$  de mix de reação no fundo do tubo contendo 10  $\mu\text{L}$  de DNA. Evitar a formação de bolhas;
4. Colocar os tubos dentro do termociclador, seguindo os ciclos a seguir:

<b>Temperatura</b>	94°C	94°C	62°C	72°C	94°C	62°C	72°C
<b>Duração</b>	1'	45''	15''	30''	45''	15''	5'
<b>Ciclos</b>	1	34	34	34	1	1	1

*Hibridação:*

1. Remover as soluções de hibridação, denaturação, conjugado SA-HRP e substrato (TMB) do refrigerador. Deixar que aqueçam à temperatura ambiente;
2. Remover o controle do refrigerador e colocar no gelo;
3. Remover o número apropriado de fitas: 1 verde e 1 branca por paciente e uma fita do controle vermelho da geladeira;
4. Preparar o Well Wash Buffer (WWB) misturando 100 mL do WWB 10x com 900 mL de água deionizada;
5. Lavar as fitas com o WWB para prepará-las para a reação de detecção (programa de reidratação na lavadora);

*Para DNA extraído com Kit*

6. Misturar 17  $\mu\text{L}$  do mix da reação de PCR, 68  $\mu\text{L}$  de água deionizada e 85  $\mu\text{L}$  de solução denaturante. Levar ao vórtex por 5 segundos. Incubar em temperatura ambiente por 10 minutos.

*Para DNA extraído por outras metodologias*

6. Misturar 8,5  $\mu\text{L}$  do mix da reação de PCR, 76,5  $\mu\text{L}$  de água deionizada e 85  $\mu\text{L}$  de solução denaturante. Levar ao vórtex por 5 segundos. Incubar em temperatura ambiente por 10 minutos.

7. Misturar 9  $\mu\text{L}$  de controle de validação de ensaio, 36  $\mu\text{L}$  de água deionizada e 45 $\mu\text{L}$  de solução denaturante. Levar ao vórtex e centrifugar por 3 segundos. Incubar em temperatura ambiente por 10 minutos;
8. Pipetar 40  $\mu\text{L}$  de solução de hibridação em cada poço nas fitas verde e branca e no controle vermelho;
9. Pipetar 10  $\mu\text{L}$  de produto de PCR denaturado dentro de cada um dos poços das fitas verde e branca;
10. Pipetar 10  $\mu\text{L}$  de controle de validação do ensaio dentro de cada um dos poços da fita de controle vermelha;
11. Misturar bem os conteúdos com leves toques na placa;
12. Cobrir a placa com uma fita de vedação e incubar a 37°C por uma hora;
13. Depois da hibridação remover a fita de vedação e lavar a placa por 5 vezes (programa de lavagem).

#### *Detecção*

1. Adicionar 50  $\mu\text{L}$  do conjugado SA-HRP em cada poço das fitas das amostras e da fita controle. Cobrir a placa com fita de vedação e incubar a 37°C por 30 minutos;
2. Remover a fita de vedação e lavar a placa (programa de lavagem);
3. Adicionar 50  $\mu\text{L}$  de substrato (TMB) dentro de cada poço das fitas de amostra e da fita controle. Incubar em temperatura ambiente por 10 minutos;
4. Acrescentar 50  $\mu\text{L}$  da solução de parada da reação (stop solution) dentro de cada poço das fitas de amostra e da fita controle;
5. Imediatamente transferir a placa para a leitora de microplaca. A leitora capta a absorbância a 450 nm e 655 nm (absorbância de referência). O aparelho calcula a diferença entre as duas absorbâncias. Posteriormente esse valor será subtraído da média dos valores de absorbância encontrada nos poços controle. Os valores encontrados após esse cálculo são utilizados para análise.

6. Cálculos específicos são realizados para determinação da presença ou ausência do alelo testado.



### III. 16. Sequenciamento

A técnica empregada foi o método enzimático de terminação da cadeia descrito por Sanger (1977). A técnica de sequenciamento teve um grande avanço com o desenvolvimento da reação de PCR, por ser um método rápido e eficiente de preparação de pequenas seqüências moldes de DNA.

O objetivo é a determinação da seqüência de nucleotídeos de uma região da molécula de DNA de interesse.

O método de Sanger baseia-se no uso de terminações específicas, o 2' 3' didesoxinucleotídeo 5' trifosfato (ddNTP), no alongamento da cadeia de DNA. Este análogo ao 2,3 desoxinucleotídeo trifosfato (dNTP) pode ser incorporado pela DNA polimerase envolvida no alongamento da cadeia de DNA através do grupo 5' trifosfato. No entanto, por causa do análogo não ter grupo hidroxil na posição 3', ele não forma uma ligação fosfodiéster com o próximo desoxinucleotídeo-5' trifosfato e a extensão da cadeia termina quando um análogo é incorporado.

Para o sequenciamento é necessário que o produto da PCR seja purificado, para evitar a presença de dímero de *primer* e outras seqüências que possam interferir na reação de sequenciamento.

## Resultados Gerais

## Resultados Gerais

As 220 amostras analisadas no presente trabalho encaminhadas ao LHGDH, eram provenientes de diferentes estados do Brasil. As figuras 7 e 8 ilustram a distribuição percentual das amostras de cada região do país e dos respectivos estados incluídos na pesquisa.

Com base nos resultados obtidos nos diferentes procedimentos, foi possível a indicação de um grande número de suspeitas; algumas variantes de hemoglobinas, entretanto, apresentaram um perfil eletroforético ou cromatográfico muito diferente dos padrões estabelecidos, sendo portanto, de difícil interpretação. Os diferentes mutantes foram agrupados considerando-se a cadeia globínica alterada; dessa forma, nas tabelas 3, 4, 5 e 6 estão relacionados os resultados dos testes de triagem e confirmação eletroforética das amostras analisadas e as respectivas suspeitas resultantes das avaliações globais das cadeias  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$  e  $\gamma$  respectivamente. A tabela 7 mostra os resultados dos testes de triagem e confirmação eletroforética para as alterações de hemoglobinas resultantes de fusão de cadeias, como a Hb Lepore. A inclusão do perfil cromatográfico facilitou o direcionamento das suspeitas diagnósticas. Muitas variantes apresentam frações anormais na eletroforese alcalina e/ou ácida ou perfil cromatográfico diferente do normal, sem no entanto, apresentarem alterações na eletroforese de cadeias globínicas. Essas variantes estão apresentadas na tabela 8. Os detalhes dos perfis cromatográficos encontram-se nos anexos. Nas amostras agrupadas na tabela 9, não foi possível a realização da eletroforese de cadeias globínicas, pois a quantidade de sangue enviada era pequena. Em alguns indivíduos não foi possível a realização dos testes de triagem e procedimentos eletroforéticos, de forma que as suspeitas foram indicadas pelos perfis cromatográficos, como nos indivíduos AR-023 e AR-025. Na tabela 10 estão relacionados os dados das amostras que apresentaram associação entre variantes de hemoglobinas e na tabela 11 estão agrupados os dados referentes às amostras que

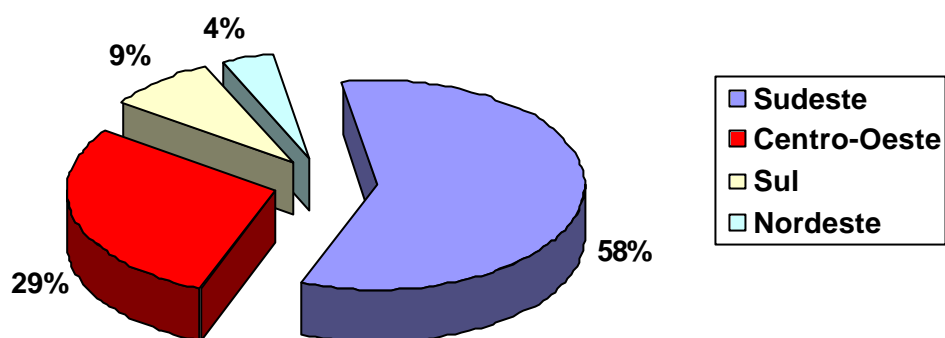


Figura 7: Valores percentuais de indivíduos amostrados, provenientes de diferentes regiões do país.

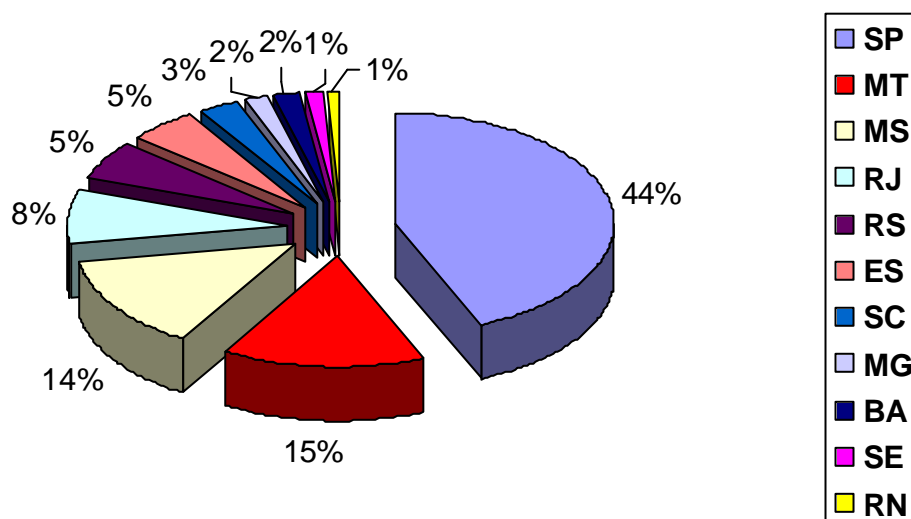


Figura 8: Valores percentuais de indivíduos amostrados, provenientes de diferentes estados do Brasil.

com perfil eletroforético para Hb S ou C, mas que apresentaram frações anormais pela análise por HPLC.

A tabela 12, que se encontra nos anexos, mostra a análise por HPLC com o equipamento Variant e o programa “beta thalassemia short” (BTS), com os respectivos tempos de retenção e porcentagem das frações de hemoglobinas encontradas.

Os achados laboratoriais das metodologias clássicas (citológicas e eletroforéticas) para o diagnóstico de hemoglobinopatias, aliados aos perfis cromatográficos obtidos por HPLC, nos forneceram indicações para a análise molecular.

As estratégias de análise foram desenhadas para cada um dos principais mutantes e os resultados são apresentados à seguir.

**Tabela 3: Prováveis mutantes de cadeia alfa indicados a partir da triagem inicial (resistência osmótica, morfologia eritrocitária e eletroforese alcalina) e testes subsequentes (eletroforese ácida, de cadeias globínicas e análise por HPLC)**

Amostras	Resistência Osmótica <sup>1</sup>	Morfologia Eritrocitária <sup>2</sup>	Eletroforese Alcalina <sup>3</sup>	Eletroforese Ácida <sup>4</sup>	Eletroforese Cadeias <sup>5</sup>	Perfil sugestivo da análise por HPLC <sup>6</sup>
AR-001	negativo	(+)	AJ	AA	alfa	J Oxford ou J Norfolk
AR-002	negativo	(n/+)	AJ	AA	alfa	J Oxford ou J Norfolk
AR-005	negativo	(+)	AJ	AA	alfa	J Oxford ou J Norfolk
AR-017	negativo	(+)	AJ	AA	alfa	J Oxford ou J Norfolk
AR-029	negativo	(++)	AJ	AA	alfa	Atago/Ube-2/JMéx./JRov./JMedel./ I
AR-030	negativo	(n/+)	AJ	AA	alfa	Atago/Ube-2/JMéx./JRov./JMedel./ I
AR-036	positivo	(+)	AS	AA	alfa	Winnipeg/ Russ/ G Philadelphia
AR-042	positivo	(++)	AF	AF	alfa	Bart's
AR-055	negativo	(n/+)	AS+?	AA	alfa	Q India/ Q Iran/ Winnipeg
AR-056	negativo	(n/+)	AFS+?	AF	alfa	Q India/ Q Iran/ Winnipeg
AR-058	negativo	(n/+)	AJ	AA	alfa	N Baltimore
AR-061	negativo	(n/+)	AS+?	AS?	alfa	Hasharon
AR-070	positivo	(+/+++)	AF+?	AF	alfa	J ou I
AR-071	positivo	(+)	AF+?	AF	alfa	J ou I
AR-075	negativo	(n/+)	AS	AA	alfa	Winnipeg/ Russ/ G Philadelphia
AR-076	negativo	(+)	AS	A+?	alfa	Winnipeg/ Russ/ G Philadelphia
AR-094	negativo	(n/+)	AJ	AA	alfa	J
AR-116	sem registro	sem registro	A+?	AF	alfa	J
AR-119	positivo	(++)	AS	A+?	alfa	G Philadelphia
AR-138	negativo	(n/+)	ASH	A?	alfa	Hasharon
AR-139	positivo	(+)	AS?	AS?	alfa	G Philadelphia
AR-146	negativo	(n/+)	ASH	AS?	alfa	Hasharon
AR-157	negativo	(n/+)	ASH	A + ?	alfa	G Philadelphia
AR-168	negativo	(n/+)	AS	AS?	alfa	Hasharon
AR-169	negativo	(n/+)	AS	sem registro	alfa	G Philadelphia
AR-170	negativo	(n/+)	ASF+acimaC	AF	alfa	
AR-174	negativo	(n/+)	AJH	AA	alfa	J Oxford
AR-175	negativo	(+)	A + fração F/S	A + acima S	alfa	Tak, Queens
AR-176	negativo	(+)	A + fração F/S	A + acima S	alfa	Tak, Queens
AR-178	negativo	(+)	ASH	AS	alfa	Hasharon
AR-184	negativo	(+)	A + banda S/F	A + S?	alfa	
AR-185	negativo	(+)	ASH	A + S?	alfa	Hasharon
AR-186	negativo	(+)	ASH	A + S?	alfa	Hasharon
AR-187	negativo	(n/+)	ASH	AA	alfa	
AR-188	positivo	(+/+++)	AFSH	AF	alfa	
AR-190	negativo	(+)	AS+ac.A+ab anidrasas	AS + abaixo S	alfa	Hasharon/alfa tal
AR-191	negativo	(+/+++)	A+S/Fab.A2+ac .A	AA	alfa	Hasharon
AR-206	negativo	(+)	A + rápida	AF	alfa	J Oxford
AR-207	negativo	(n/+)	A + rápida	AF	alfa	J Oxford
AR-210	negativo	(n/+)	A+S?+banda anid.	AS?	alfa	Stanleyville II ou G Philadelphia
AR-220	negativo	(+)	A+?	A+S fraca	alfa	Hasharon
AR-222	negativo	(+)	ASH	A+?	alfa	Hasharon
AR-223	negativo	(n/+)	ASH	A + ?	alfa	Hasharon

1 Nas amostras com resistência normal à hemólise, visualizam-se as linhas pretas da folha posicionada atrás dos tubos (resultado negativo);

Nas amostras com resistência aumentada, tais linhas não são visíveis (resultado positivo);

2 Células normais (n), com alterações discretas (+), alterações moderadas (++) , alterações acentuadas (+++) e intermediários (n/+), (+/+++), (++/+++);

3 Padrão normal: AA; padrão alterado: diferente de AA;

4 Padrão normal: AA; padrão alterado: diferente de AA;

5 Padrão normal: cadeias normais; padrão alterado: cadeias alfa, beta, delta, gama, delta/beta;

6 Suspeitas com base na análise por HPLC combinada aos testes anteriores.

**Tabela 4: Prováveis mutantes de cadeia beta indicados a partir da triagem inicial (resistência osmótica, morfologia eritrocitária eletroforese alcalina) e testes subsequentes (eletroforese ácida, de cadeias globínicas e análise por HPLC)**

Amostras	Resistência Osmótica <sup>1</sup>	Morfologia Eritrocitária <sup>2</sup>	Eletroforese Alcalina <sup>3</sup>	Eletroforese Ácida <sup>4</sup>	Eletroforese Cadeias <sup>5</sup>	Perfil sugestivo da análise por HPLC <sup>6</sup>
AR-010	negativo	(n/+)	AS	AA	beta	AD-Los Angeles
AR-011	negativo	(+)	AS	AA	beta	Korle-Bu
AR-031	negativo	(n/+)	AS	AA	beta	AD Los Angeles
AR-032	negativo	(n/+)	AS	AA	beta	Korle-Bu
AR-033	negativo	(+)	AS	AA	beta	AD Los Angeles
AR-035	negativo	(n/+)	AS	AA	beta	AD Los Angeles
AR-037	positivo	(n/+)	AS	AA	beta	AD Los Angeles
AR-040	negativo	(n/+)	AS	AA	beta	AD Los Angeles
AR-047	negativo	(+)	AS	A+?	beta	Korle-Bu
AR-048	negativo	(+)	ASF	AF+?	beta	Korle-Bu
AR-049	negativo	(+)	AS+?	AA	beta	Korle-Bu
AR-059	negativo	(n/+)	AS	AS	beta	
AR-060	negativo	(n/+)	AS	AA	beta	AD Los Angeles
AR-063	negativo	(+/++)	AFS	AFS	beta	
AR-069	negativo	(n/+)	AJ	AF	beta	Pyrgos, hope, K Woolwich,
AR-079	negativo	(n/+)	AFS?	AS?	beta	Tak/G San Jose/ GSzuhu/
AR-098	negativo	(+)	AS	AA	beta	
AR-100	negativo	(+)	A+?	A+?	beta	
AR-102	negativo	(n/+)	A+?	sem registro	acima beta	
AR-103	negativo	(++)	AA2dim +?	sem registro	acima beta	
AR-110	positivo	(+)	AC + ?	AC	beta	
AR-113	negativo	(n/+)	AF+?	AA	beta	J-Baltimore
AR-114	negativo	(n/+)	AF+?	AF	beta	J-Baltimore
AR-121	negativo	(+)	AS	AF	beta	AD-Los Angeles
AR-130	negativo	(n/+)	AS	AA	beta	AD-Los Angeles
AR-131	positivo	(+)	SS	AA	beta	D-Los Angeles/talassemia beta
AR-132	negativo	(n/+)	AS	AS	beta	
AR-133	negativo	(n/+)	AS	AS	beta	
AR-135	positivo	(n/+)	AS	AA	beta	AD-Los Angeles
AR-136	positivo	(n/+)	AdimFS	AA	beta	AD-Los Angeles
AR-137	positivo	(+)	AS	AA	beta	AD-Los Angeles
AR-141	negativo	(n/+)	AS ? H	AA	beta	Korle-Bu
AR-142	negativo	(+)	AS ? H	AA	beta	Korle-Bu
AR-143	negativo	(n/+)	AS ? H	AA	beta	Korle-Bu
AR-144	negativo	(n/+)	SS ? H	AS	beta	Korle-Bu/S
AR-147	negativo	(n/+)	A(S/F)H	AA	beta	Osu-Christiansborg
AR-148	negativo	(n/+)	A(S/F)H	AA	beta	Osu-Christiansborg
AR-149	positivo	(++/+++)	ASH	A?	beta	Siriraj, Q Thailand
AR-156	negativo	(++)	SS	Interm.A/S	beta e delta/beta	D-Los Angeles/Lepore
AR-158	negativo	(+)	AS? + H	AA	beta	
AR-160	negativo	(n/+)	AS + ?	ASF	beta	
AR-161	negativo	(+)	AJ	AA	beta	J Bangkok
AR-163	negativo	(n/+)	AS	AA	beta	AD-Los Angeles
AR-164	negativo	(+)	ASH	A?	beta	
AR-171	negativo	(n/+)	AS	AA	beta	AD-Los Angeles
AR-177	negativo	(+)	A+ acima S	AA	beta	G-San José
AR-179	negativo	(+/++)	AS	A+anormal	beta	
AR-180	negativo	(+)	AS	AA	beta	AD-Los Angeles
AR-196	negativo	(n/+)	AS	AA	beta	AD-Los Angeles
AR-197	negativo	(n/+)	A + rápida	AF	beta	K, Candem, I-Philadelphia
AR-199	positivo	(+/++)	SS	AA	beta	D-Los Angeles/talassemia beta

Continuação da tabela 4

Amostras	Resistência Osmótica <sup>1</sup>	Morfologia Eritrocitária <sup>2</sup>	Eletroforese Alcalina <sup>3</sup>	Eletroforese Ácida <sup>4</sup>	Eletroforese Cadeias <sup>5</sup>	Perfil sugestivo da análise por HPLC <sup>6</sup>
AR-200	negativo	(n/+)	ASH	AA	beta	AD-Los Angeles
AR-201	negativo	(n/+)	ASH	AA	beta	AD-Los Angeles
AR-208	positivo	(+/++)	SSF	AS	beta	SD-Los Angeles
AR-209	negativo	(n/+)	AS	AA	beta	AD-Los Angeles
AR-212	negativo	(n/+)	AFS+H	AA	beta	AD-Los Angeles
AR-213	negativo	(n/+)	AS	AA	beta	AD-Los Angeles
AR-214	negativo	(n/+)	AS	AA	beta	Korle-Bu
AR-215	negativo	(n/+)	AFS	AA	beta	Korle-Bu
AR-216	negativo	(n/+)	AS	AA	beta	AD-Los Angeles
AR-217	negativo	(n/+)	AS	AA	beta	AD-Los Angeles
AR-218	negativo	(n/+)	AS	AA	beta	AD-Los Angeles
AR-219	negativo	(n/+)	AS	AA	beta	AD-Los Angeles
AR-221	negativo	(+)	ASH	AA	beta	AD-Los Angeles
AR-227	negativo	(+)	A+acim. A	AF	beta	J Baltimore
AR-228	positivo	(+/++)	AC	AF	beta	AE
AR-234	positivo	(++)	AS	AA	beta	AD-Los Angeles
AR-235	negativo	(n/+)	A + rápida	AF	beta	J Baltimore
AR-236	Positivo	(++)	ASH	AA	beta	A D-Los Angeles
AR-237	negativo	(n/+)	AS	AA	beta	A D-Los Angeles
AR-238	negativo	(+)	ASH	AA	beta	A D-Los Angeles
AR-239	negativo	(+)	ASH	AA	beta	A D-Los Angeles
AR-240	negativo	(+/++)	ASF	AF	beta	A D-Los Angeles

1 Nas amostras com resistência normal à hemólise, visualizam-se as linhas pretas da folha posicionada atrás dos tubos (resultado negativo);

Nas amostras com resistência aumentada, tais linhas não são visíveis (resultado positivo);

2 Células normais (n), com alterações discretas (+), alterações moderadas (++) e alterações acentuadas (+++) e intermediários (n/+), (+/++), (++/+++);

3 Padrão normal: AA; padrão alterado: diferente de AA;

4 Padrão normal: AA; padrão alterado: diferente de AA;

5 Padrão normal: cadeias normais; padrão alterado: cadeias alfa, beta, delta, gama, delta/beta;

6 Suspeitas com base na análise por HPLC combinada aos testes anteriores.

**Tabela 5: Prováveis mutantes de cadeia delta indicados a partir da triagem inicial (resistência osmótica, morfologia eritrocitária e eletroforese alcalina) e testes subsequentes (eletroforese ácida, de cadeias globínicas e análise por HPLC)**

Amostras	Resistência Osmótica <sup>1</sup>	Morfologia Eritrocitária <sup>2</sup>	Eletroforese Alcalina <sup>3</sup>	Eletroforese Ácida <sup>4</sup>	Eletroforese Cadeias <sup>5</sup>	Perfil sugestivo da análise por HPLC <sup>6</sup>
AR-016	negativo	(n/+)	A+?	AS?	delta	A <sub>2</sub> Puglia ou Udine
AR-019	sem registro	sem registro	A+?	AA	delta	A <sub>2</sub> Puglia ou Udine
AR-041	negativo	(+)	A+?	AA	delta	A <sub>2</sub> Puglia ou Udine
AR-090	negativo	(++)	A+?	AF	delta	
AR-091	positivo	(++)	A+?	sem registro	delta	
AR-092	negativo	(n/+)	A+?	sem registro	delta	
AR-095	negativo	(+)	A+?	AF	delta	Hope, Little Rock
AR-101	positivo	(+/+++)	A+?	AA	delta	
AR-150	negativo	(+)	AAH	AF	delta	Hope, Little Rock
AR-151	negativo	(+)	AF	AF	delta	Hope, Little Rock
AR-167	negativo	(n/+)	A+anidr.+H	AF	delta	A <sub>2</sub> Puglia, A <sub>2</sub> Udine, A <sub>2</sub> B <sub>2</sub>

1 Nas amostras com resistência normal à hemólise, visualizam-se as linhas pretas da folha posicionada atrás dos tubos (resultado negativo);

Nas amostras com resistência aumentada, tais linhas não são visíveis (resultado positivo);

2 Células normais (n), com alterações discretas (+), alterações moderadas (++) , alterações acentuadas (+++) e intermediários (n/+), (+/+++), (++/+++);

3 Padrão normal: AA; padrão alterado: diferente de AA;

4 Padrão normal: AA; padrão alterado: diferente de AA;

5 Padrão normal: cadeias normais; padrão alterado: cadeias alfa, beta, delta, gama, delta/beta;

6 Suspeitas com base na análise por HPLC combinada aos testes anteriores.

**Tabela 6: Prováveis mutantes de cadeia gama indicados a partir da triagem inicial (resistência osmótica, morfologia eritrocitária e eletroforese alcalina) e testes subsequentes (eletroforese ácida, de cadeias globínicas e análise por HPLC)**

Amostras	Resistência Osmótica <sup>1</sup>	Morfologia Eritrocitária <sup>2</sup>	Eletroforese Alcalina <sup>3</sup>	Eletroforese Ácida <sup>4</sup>	Eletroforese Cadeias <sup>5</sup>	Perfil sugestivo da análise por HPLC <sup>6</sup>
AR-012	negativo	(n/+)	A+?	AF	gama	F Texas/ F Kuala Lumpur
AR-096	negativo	(n/+)	AA	AF	gama	

1 Nas amostras com resistência normal à hemólise, visualiza-se as linhas pretas da folha posicionada atrás dos tubos (resultado negativo);

Nas amostras com resistência aumentada, tais linhas não são visíveis (resultado positivo);

2 Células normais (n), com alterações discretas (+), alterações moderadas (++) , alterações acentuadas (+++) e intermediários (n/+), (+/+++), (++/+++);

3 Padrão normal: AA; padrão alterado: diferente de AA;

4 Padrão normal: AA; padrão alterado: diferente de AA;

5 Padrão normal: cadeias normais; padrão alterado: cadeias alfa, beta, delta, gama, delta/beta;

6 Suspeitas com base na análise por HPLC combinada aos testes anteriores.

**Tabela 7: Prováveis mutantes de cadeia delta/beta indicados a partir da triagem inicial (resistência osmótica, morfologia eritrocitária e eletroforese alcalina) e testes subsequentes (eletroforese ácida, de cadeias globínicas e análise por HPLC)**

Amostras	Resistência Osmótica <sup>1</sup>	Morfologia Eritrocitária <sup>2</sup>	Eletroforese Alcalina <sup>3</sup>	Eletroforese Ácida <sup>4</sup>	Eletroforese Cadeias <sup>5</sup>	Perfil sugestivo da análise por HPLC <sup>6</sup>
AR-026	negativo	(+)	A+Lepore	AA	delta/beta	Lepore
AR-034	negativo	(+)	A+Lepore	AA	delta/beta	Lepore
AR-112	negativo	(n/+)	AF+?	AA	delta/beta	Lepore
AR-145	negativo	(+/++)	AS?	AA	delta/beta	Lepore
AR-155	negativo	(+)	AS	AF	delta/beta	Lepore
AR-211	negativo	(n/+)	AS	AA	delta/beta	Lepore

1 Nas amostras com resistência normal à hemólise, visualizam-se as linhas pretas da folha posicionada atrás dos tubos (resultado negativo);

Nas amostras com resistência aumentada, tais linhas não são visíveis (resultado positivo);

2 Células normais (n), com alterações discretas (+), alterações moderadas (++) e alterações acentuadas (+++) e intermediários (n/+), (+/++), (++++);

3 Padrão normal: AA; padrão alterado: diferente de AA;

4 Padrão normal: AA; padrão alterado: diferente de AA;

5 Padrão normal: cadeias normais; padrão alterado: cadeias alfa, beta, delta, gama, delta/beta;

6 Suspeitas com base na análise por HPLC combinada aos testes anteriores.

**Tabela 8: Prováveis mutantes com cadeias globínicas normais indicados a partir da triagem inicial (resistência osmótica, morfologia eritrocitária e eletroforese alcalina) e testes subsequentes (eletroforese ácida, de cadeias globínicas e análise por HPLC)**

Amostras	Resistência Osmótica <sup>1</sup>	Morfologia Eritrocitária <sup>2</sup>	Eletroforese Alcalina <sup>3</sup>	Eletroforese Ácida <sup>4</sup>	Eletroforese Cadeias <sup>5</sup>	Perfil sugestivo da análise por HPLC <sup>6</sup>
AR-057	negativo	(n/+)	AF+?	AF	normal	St. Louis, Newcastle, Richmond
AR-106	negativo	(n/+)	AA	AF	normal	
AR-107	negativo	(n/+)	AA	AA	normal	
AR-108	negativo	(n/+)	AA	AF	normal	
AR-109	negativo	(n/+)	AF	A+?	normal	
AR-111	negativo	(n/+)	A+?	AA	normal	
AR-152	positivo	(+++)	AF+ 2 bandas acima A	AF	normal	Providence
AR-153	negativo	(+)	AA2aum+banda acima A	A + (S/F)	normal	Richmond
AR-154	negativo	(+)	A+banda acima A+H	AF	normal	
AR-166	negativo	(++)	A+banda A2	AA	normal	
AR-173	positivo	(+)	AH + rápida	AA	normal	
AR-181	negativo	(n/+)	A+acima A	AA	normal	
AR-192	negativo	(n/+)	AA+H+2 fraçõesA2	A + S?	normal	Instável
AR-193	negativo	(+)	AA2aum+banda prox. A2	AF	normal	
AR-194	negativo	(+)	A+ acima A	AF	normal	
AR-226	negativo	(n/+)	AF + acima A	AF	normal	
AR-229	positivo	(+)	A+2 frações A2	A + S?	normal	Instável
AR-230	negativo	(+/++)	ASH + ?	A + acima A	normal	
AR-231	negativo	(+)	A+ acima A	A + abaixo S	normal	

1 Nas amostras com resistência normal à hemólise, visualiza-se as linhas pretas da folha posicionada atrás dos tubos (resultado negativo);

Nas amostras com resistência aumentada, tais linhas não são visíveis (resultado positivo);

2 Células normais (n), com alterações discretas (+), alterações moderadas (++) e alterações acentuadas (+++) e intermediários (n/+), (+/++), (++++);

3 Padrão normal: AA; padrão alterado: diferente de AA;

4 Padrão normal: AA; padrão alterado: diferente de AA;

5 Padrão normal: cadeias normais; padrão alterado: cadeias alfa, beta, delta, gama, delta/beta;

6 Suspeitas com base na análise por HPLC combinada aos testes anteriores.

**Tabela 9: Prováveis mutantes sem registro de cadeias globínicas indicados a partir da triagem inicial (resistência osmótica, morfologia eritrocitária e eletroforese alcalina) e testes subsequentes (eletroforese ácida e análise por HPLC)**

Amostras	Resistência Osmótica <sup>1</sup>	Morfologia Eritrocitária <sup>2</sup>	Eletroforese Alcalina <sup>3</sup>	Eletroforese Ácida <sup>4</sup>	Eletroforese Cadeias <sup>5</sup>	Perfil sugestivo da análise por HPLC <sup>6</sup>
AR-013	negativo	(+)	A+?	AF	sem registro	Shep.Bush/Malmo/NY/Chesap./
AR-015	negativo	(n/+)	AS	?	sem registro	Hasharon
AR-018	negativo	(+)	AF	sem registro	sem registro	Deer Lodge
AR-020	negativo	(+/++)	A+?	sem registro	sem registro	
AR-021	positivo	(n/+)	A+?	?	sem registro	
AR-022	negativo	sem registro	A+?	sem registro	sem registro	Shep.Bush/Malmo/NY/Chesap./
AR-023	sem registro	sem registro	sem registro	sem registro	sem registro	Candem ou N Baltimore
AR-024	positivo	(++/+++)	A+?	sem registro	sem registro	
AR-025	sem registro	sem registro	sem registro	sem registro	sem registro	Candem ou N Baltimore
AR-028	positivo	(++/+++)	A+?	sem registro	sem registro	
AR-053	negativo	(+)	AS	sem registro	sem registro	Okayama
AR-093	negativo	(+)	A+?	AF	sem registro	
AR-097	negativo	(n/+)	AS	AS?	sem registro	
AR-104	negativo	(n/+)	A+?	AF	sem registro	
AR-105	negativo	(n/+)	AC + ?	sem registro	sem registro	
AR-118	negativo	(+)	AS+A2aum	AS?	sem registro	
AR-182	negativo	(+)	AH + rápida	AA	sem registro	
AR-183	negativo	(n/+)	AFH + rápida	AA	sem registro	

1 Nas amostras com resistência normal à hemólise, visualizam-se as linhas pretas da folha posicionada atrás dos tubos (resultado negativo);

Nas amostras com resistência aumentada, tais linhas não são visíveis (resultado positivo);

2 Células normais (n), com alterações discretas (+), alterações moderadas (++) , alterações acentuadas (+++) e intermediários (n/+), (+/++), (++/+++)

3 Padrão normal: AA; padrão alterado: diferente de AA;

4 Padrão normal: AA; padrão alterado: diferente de AA;

5 Padrão normal: cadeias normais; padrão alterado: cadeias alfa, beta, delta, gama, delta/beta;

6 Suspeitas com base na análise por HPLC combinada aos testes anteriores.

**Tabela 10: Prováveis mutantes com associações indicados a partir da triagem inicial (resistência osmótica, morfologia eritrocitária e eletroforese alcalina) e testes subsequentes (eletroforese ácida, de cadeias globínicas e análise por HPLC)**

Amostras	Resistência Osmótica <sup>1</sup>	Morfologia Eritrocitária <sup>2</sup>	Eletroforese Alcalina <sup>3</sup>	Eletroforese Ácida <sup>4</sup>	Eletroforese Cadeias <sup>5</sup>	Perfil sugestivo da análise por HPLC <sup>6</sup>
AR-077	negativo	(n/+)	AFS	AFS	alfa e beta	Malmo/ Wood
AR-099	negativo	(+)	AS	AS?	beta e gama	
AR-120	negativo	(+/++)	AS	AS	beta e delta	
AR-172	negativo	(n/+)	ASH+ráp	AS+anormal	alfa	Grady + S + alfa livres
AR-203	positivo	(+)	ACH	A+2bandas	beta	C + variante
AR-204	negativo	(+)	ASCH	AS	alfa e beta	AS + Constant Spring
AR-205	sem registro	sem registro	sem registro	sem registro	alfa e beta	AS + Constant Spring
AR-224	negativo	(n/+)	AS?	A + ?	alfa	S + G
AR-225	negativo	(n/+)	AFS+ ? + H	AF + ?	alfa	S + G
AR-233	negativo	(++)	ASC	AS	alfa	AS + mutante de alfa

1 Nas amostras com resistência normal à hemólise, visualizam-se as linhas pretas da folha posicionada atrás dos tubos (resultado negativo);

Nas amostras com resistência aumentada, tais linhas não são visíveis (resultado positivo);

2 Células normais (n), com alterações discretas (+), alterações moderadas (++) , alterações acentuadas (+++) e intermediários (n/+), (+/++), (++/+++)

3 Padrão normal: AA; padrão alterado: diferente de AA;

4 Padrão normal: AA; padrão alterado: diferente de AA;

5 Padrão normal: cadeias normais; padrão alterado: cadeias alfa, beta, delta, gama, delta/beta;

6 Suspeitas com base na análise por HPLC combinada aos testes anteriores.

**Tabela 11: Prováveis mutantes com perfil de Hb S ou C indicados a partir da triagem inicial (resistência osmótica, morfologia eritrocitária e eletroforese alcalina) e testes subsequentes (eletroforese ácida, de cadeias globínicas e análise por HPLC)**

Amostras	Resistência Osmótica <sup>1</sup>	Morfologia Eritrocitária <sup>2</sup>	Eletroforese Alcalina <sup>3</sup>	Eletroforese Ácida <sup>4</sup>	Eletroforese Cadeias <sup>5</sup>	Perfil sugestivo da análise por HPLC <sup>6</sup>
AR-014	negativo	(n/+)	AS	AS	sem registro	AS
AR-038	positivo	(n/+)	AS	AA	beta	AS
AR-043	negativo	(n/+)	AFS	sem registro	sem registro	AFS
AR-044	positivo	(+)	SF	SF	sem registro	SF
AR-045	positivo	(+)	AS	AS	sem registro	AS+ talassemia
AR-046	positivo	(+/++)	AS	AS	sem registro	AS
AR-050	sem registro	sem registro	SS	SS	beta	SS
AR-051	negativo	(+)	AS	AS	sem registro	AS
AR-052	negativo	(+/++)	AS	AS	sem registro	ASH
AR-062	positivo	(n/+)	SCF	AF	sem registro	SFC
AR-064	negativo	(+)	AS	sem registro	sem registro	AS
AR-065	positivo	(+)	AS	AFS	sem registro	ASH
AR-066	negativo	(+/++)	AS+?	AS	sem registro	AS+?
AR-067	sem registro	sem registro	SF	SF	sem registro	SFH
AR-068	negativo	(++)	AS	ASF	sem registro	AS
AR-074	positivo	(+++)	SS	SS	sem registro	SF
AR-078	negativo	(+)	AS?	AS?	beta	ASH
AR-080	positivo	(+)	AS	AS	sem registro	AS
AR-081	positivo	(n/+)	SC	SC	beta	SC
AR-082	negativo	(n/+)	ACH	AC	beta	ACH
AR-083	negativo	(+)	ACH+S?	sem registro	sem registro	ASCH
AR-084	negativo	(+/++)	SC+F	sem registro	sem registro	SCF
AR-085	negativo	(+)	SC	SCAF	sem registro	SC
AR-086	negativo	(n/+)	ACH	AC+?	sem registro	ACH
AR-087	positivo	(+/++)	FACH	sem registro	sem registro	FACH
AR-122	negativo	(+)	AS	AS	beta	ASH
AR-123	negativo	(n/+)	ASF+A2aum	AS	beta	AS
AR-124	negativo	(n/+)	AS	AS	beta	AS
AR-125	negativo	(n/+)	ASF	AS	beta	AS
AR-126	negativo	(n/+)	ASF?	AS?	beta	ASF
AR-127	negativo	(n/+)	AS?	AS?	beta	ASH
AR-128	negativo	(n/+)	AS	AS	beta	AS
AR-129	negativo	(n/+)	AS	AS	beta	AS
AR-140	negativo	(n/+)	ASH	ASF	beta	AFS
AR-159	negativo	(+)	FS	FS	beta	SS
AR-162	negativo	(+)	AS	AS?	beta	AS
AR-165	negativo	(n/+)	AS + rápida	ASF	beta	AS
AR-195	negativo	(n/+)	ASH+A2aum	AS	beta	AS

1 Nas amostras com resistência normal à hemólise, visualiza-se as linhas pretas da folha posicionada atrás dos tubos (resultado negativo);

Nas amostras com resistência aumentada, tais linhas não são visíveis (resultado positivo);

2 Células normais (n), com alterações discretas (+), alterações moderadas (++) , alterações acentuadas (+++) e intermediários (n/+), (+/++), (++++);

3 Padrão normal: AA; padrão alterado: diferente de AA;

4 Padrão normal: AA; padrão alterado: diferente de AA;

5 Padrão normal: cadeias normais; padrão alterado: cadeias alfa, beta, delta, gama, delta/beta;

6 Suspeitas com base na análise por HPLC combinada aos testes anteriores.

Discussão

## **Discussão Geral**

A análise geral dos resultados obtidos permitem-nos destacar alguns aspectos relevantes para discussão.

A investigação das variantes de hemoglobinas por metodologias clássicas, que incluem procedimentos eletroforéticos em diferentes condições experimentais e HPLC resultou na confecção de tabelas, em que foram agrupados os diferentes mutantes de hemoglobinas. Muitas hemoglobinopatias são regionalmente específicas e devido ao intenso fluxo de imigrantes entre as diferentes regiões do mundo, hoje podem ser encontradas em diversos países. O Brasil foi inicialmente colonizado por portugueses no século XVI, período em que teve início a miscigenação entre colonizadores e ameríndias nativas. Posteriormente, com o tráfico de escravos, o negro passou a ser o principal grupo de miscigenação com o branco. Somente nos séculos XIX e XX, o país passou a receber imigrantes de diversas nacionalidades, principalmente europeias, mas também asiáticas e do oriente médio. Atualmente, o Brasil é um país altamente miscigenado e apresenta intensa heterogeneidade entre suas diferentes regiões (Salzano e Freire-Maia, 1967). Essa heterogeneidade é devida ao padrão peculiar de colonização dessas regiões, uma vez que variou o número de indivíduos que compuseram o estoque genético de cada grupamento étnico parental. A região Norte, por exemplo, é a que exibe a maior contribuição ameríndia, enquanto que no Sul do país é observada a maior proporção de caucasóides (Carvalho-Silva et al., 2001). Apesar da maior parte das amostras analisadas serem provenientes dos estados da região Sudeste, acreditamos que essa população apresente características encontradas por todo o país, uma vez que o padrão regional de miscigenação foi consideravelmente alterado pelas correntes de migração interna, fazendo da região Sudeste o principal destino de grande contingente desses migrantes. Um estudo em que foram analisados 200 homens brasileiros não relacionados, considerados brancos, provenientes de grandes centros urbanos das quatro maiores regiões geográficas do Brasil, mostrou que esses indivíduos apresentaram valores intermediários entre europeus e africanos, segundo o índice

analisado. Desse modo, nota-se que a cor da pele não pode ser utilizada como um parâmetro na predição da ancestralidade africana (Parra et al., 2003). Fica evidente que a grande variação de mutantes aqui encontrada reflete a diversidade genética da nossa população.

Nas metodologias de análise foram incluídos os testes de resistência globular osmótica em cloreto de sódio a 0,36%, a análise da morfologia eritrocitária à fresco e a eletroforese em acetato de celulose, pH alcalino, testes reconhecidos como de triagem inicial para hemoglobinopatias. O teste de resistência globular osmótica é utilizado para detectar talassemia beta principalmente na forma heterozigota, pois nesses casos os eritrócitos microcíticos são mais resistentes à hemólise nessa solução. Cerca de 97% dos portadores dessa forma de talassemia apresentam positividade para esse teste; entretanto, a resistência globular não é específica para talassemia beta heterozigota, já que os resultados positivos são encontrados também em anemias carenciais e outras hemoglobinopatias, como os heterozigotos para hemoglobina C. Na análise da morfologia eritrocitária são avaliados o tamanho, a forma e a coloração dos eritrócitos. Também não é um teste específico, pois em anemias ferroprivas encontram-se células com microcitose e hipocromia, alterações observadas na talassemia beta heterozigota e nos portadores de associações de hemoglobinas anormais, como Hb D-Los Angeles e talassemia beta, por exemplo. A eletroforese em pH alcalino pode ser realizada em diferentes suportes, como o acetato de celulose ou gel de agarose. É utilizada para a qualificação e quantificação de hemoglobinas normais e anormais. As diferentes mobilidades eletroforéticas das hemoglobinas anormais são originadas por alterações de carga elétrica, causadas por substituições de aminoácidos no polipeptídeo. As substituições que não alteram a carga total da proteína geram hemoglobinas anormais que apresentam a mesma migração que a Hb A. Da mesma forma, as proteínas geradas por substituições com cargas semelhantes à outras variantes, apresentarão migração similar neste pH. Os testes de triagem, isoladamente não são específicos para quaisquer hemoglobinopatias; porém em combinação, podem auxiliar no diagnóstico da alteração e direcionamento dos procedimentos

subsequentes e ajudar a entender os processos fisiopatológicos associados ao distúrbio genético em questão.

A identificação de hemoglobinas anormais em eletroforese, pH alcalino é a metodologia mais amplamente utilizada, por seu baixo custo e facilidade de manuseio, permitindo distinguir as amostras com hemoglobinas normais das variantes; porém, como sua sensibilidade é limitada, não é possível discriminar a hemoglobina S de outras variantes que apresentam o mesmo padrão de migração.

Alguns testes subsequentes, como eletroforese em gel de ágar, pH ácido e eletroforese de cadeias globínicas em acetato de celulose, pH alcalino foram realizados. A eletroforese em gel de ágar fosfato, pH 6,2 é específica para diferenciar alguns tipos de hemoglobinas mais lentas que a hemoglobina A como por exemplo, Hb S das Hb D e a Hb C da Hb E, que em pH alcalino apresentam co-migração, dificultando sua análise. Entretanto, as variantes D-Los Angeles e Korle-Bu apresentaram o mesmo perfil eletroforético nestes procedimentos, ou sejam migram de forma semelhante à Hb S em pH alcalino, como Hb A em pH ácido.

A eletroforese de cadeias globínicas, pH alcalino se constitui em uma pré-análise molecular. Essa técnica apresenta boa resolução para os mutantes de cadeia alfa e beta; para os mutantes de cadeias gama e delta, sua sensibilidade é limitada, uma vez que estes genes são expressos com maior intensidade em períodos definidos do desenvolvimento enquanto que no indivíduo adulto, expressam-se em pequenas quantidades. Também apresenta limitações com relação a algumas variantes, como por exemplo, Hb D-Los Angeles e Hb Korle-Bu, pois apresentam uma fração similar a  $\beta^S$  na eletroforese de cadeias globínicas.

A focalização isoelétrica, apesar de ser bastante específica quanto ao padrão de migração, não forneceu dados significativos para nossas análises, pois com o equipamento utilizado não foi possível a visualização das diferenças entre variantes que apresentam pontos isoelétricos semelhantes. A utilização apenas dessa metodologia pode levar a diagnósticos imprecisos e sugerimos sua

utilização para complementar resultados e no rastreamento de hemoglobinas anormais.

O estudo de hemoglobinopatias por HPLC não permite afirmar concretamente o mutante encontrado na grande maioria dos casos, mas pode ser utilizado como teste complementar na identificação dessas anormalidades. A padronização dos tempos de retenção foi feita na população norte americana. Torna-se necessária a padronização dos resultados normais e das hemoglobinas variantes para a população brasileira, além do estabelecimento dos padrões para cada laboratório, considerando que pequenas variações nos tempos de retenção das frações de hemoglobinas são aceitáveis.

Após a realização desses testes e da análise por HPLC foram estabelecidas as suspeitas para os prováveis mutantes. Em alguns casos, não foi possível o estabelecimento de suspeitas, uma vez que os padrões eletroforéticos ou cromatográficos diferiam dos perfis conhecidos, sem a identificação dos mutantes.

Da grande variedade de resultados encontrados, algumas variantes de hemoglobinas foram analisadas molecularmente, como as Hb D-Los Angeles, Hb E e Hb Hasharon. Novos estudos serão realizados posteriormente para elucidação das diversas mutações e casos duvidosos.

As amostras de Hb D-Los Angeles avaliadas neste trabalho apresentaram padrões de migração nos procedimentos eletroforéticos compatíveis com os descritos na literatura. Pela análise da HPLC, a maioria das amostras foram eluídas na janela de Hb D, com exceção de poucas amostras eluídas na janela de Hb S. Os perfis eletroforéticos auxiliaram na elucidação desses casos. Pela HPLC o tempo de retenção médio para a janela de Hb D foi de 4,24 com mínimo de 4,1 e máximo de 4,32, dentro dos limites estabelecidos pelo fabricante, porém com variação menor. Existem dados discordantes na literatura quanto à porcentagem de Hb A<sub>2</sub> nas amostras com Hb D-Los Angeles. Em nossos achados, a grande maioria das amostras analisadas apresentaram valores abaixo da normalidade. A co-herança de Hb D-Los Angeles e talassemia beta poderia ser confundida com homozigose para Hb D, fato elucidado pela utilização de técnicas

moleculares além da avaliação por HPLC. A associação de Hb D-Los Angeles com outras variantes, como as descritas nesse trabalho, não são inesperadas se levarmos em consideração a grande miscigenação racial ocorrida no Brasil. Sua investigação é de extrema importância para o estabelecimento de conduta adequada, além do aconselhamento genético.

A Hb E apresenta uma alta frequência em determinados países, como a Tailândia e o Camboja. Sua herança juntamente com talassemia beta apresenta manifestações clínicas que variam de sintomas brandos à graves, tornando-se um dos maiores problemas de saúde pública nesses países. No Brasil, poucos indivíduos portadores dessa variante foram descritos. Sua frequência ainda é baixa, mas tem aumentado devido as melhorias nos procedimentos de diagnóstico laboratorial e ao crescente fluxo migratório dos países Asiáticos para as Américas.

Apesar de alguns relatos na literatura, poucas informações podem ser obtidas a respeito da variante Hasharon. O diagnóstico correto é importante pois esta hemoglobina apresenta migração semelhante à Hb S em pH alcalino, sendo entretanto, um mutante de cadeia alfa. Este fato pode ter subestimado sua frequência no Brasil, uma vez que é comum em italianos, povo com grande influência na formação da população brasileira, especialmente no sudeste e sul do país; além disso, os procedimentos de análise laboratorial em sua maioria utilizados são os eletroforéticos. Pela sua condição benigna em heterozigose, é rastreada principalmente em estudos populacionais.

Fato que merece atenção é a presença de mais de uma suspeita diagnóstica para alguns mutantes. Pelas técnicas clássicas de análise, muitas vezes não foi possível definir apenas uma mutação suspeita, e sim um grupo de suspeitas cujas hemoglobinas se comportam de maneira semelhante nos testes realizados. A utilização de mapas de migração facilita a identificação das possíveis variantes; entretanto, tais mapas apresentam-se incompletos diante dos mais de 800 tipos de hemoglobinas diferentes. Os manuais com perfis cromatográficos auxiliam na interpretação, mas também estão incompletos.

Algumas variantes apesar de diferirem em procedimentos eletroforéticos e/ou cromatográficos apresentaram o perfil eletroforético para cadeias globínicas compatível como o padrão normal. Provavelmente essas variantes apresentam mutações que não alteram a carga elétrica da globina; dessa forma a globina alterada migra na mesma posição das globinas normais. Algumas amostras devem ser novamente investigadas, pois apresentaram padrões normais nos procedimentos eletroforéticos, sendo incluídas na tabela 8 por apresentarem uma pequena banda anormal pela análise por HPLC.

Nas amostras em que não foi possível a realização da eletroforese de cadeias globínicas tornou-se difícil o estabelecimento de suspeitas, uma vez que o conhecimento da cadeia mutada pode direcionar a procura pela variante que mais se assemelhe aos resultados obtidos nos procedimentos anteriores.

Algumas hemoglobinas apresentaram perfil eletroforético muito parecido com Hb S ou Hb C em pH alcalino, diferindo apenas em alguns procedimentos eletroforéticos ou apresentando uma fração anormal na HPLC. Denota-se que o reconhecimento das hemoglobinas anormais, mesmo as mais conhecidas, como Hb S e C dever ser realizado com a utilização de técnicas adequadas e de boa sensibilidade; desse modo, é imprescindível a utilização de várias metodologias para a identificação do mutante ou o direcionamento da análise molecular para a caracterização da variante. Testes moleculares devem ser realizados para a confirmação dessas suspeitas.

Outro aspecto a ser discutido é a melhoria das técnicas de análise para hemoglobinopatias. As metodologias mais antigas têm sido aperfeiçoadas, permitindo uma melhor definição de bandas nos procedimentos eletroforéticos. Além disso, a utilização da HPLC para a identificação das hemoglobinas variantes e das cadeias globínicas alteradas tem aumentado. A HPLC é um método de identificação de maior acurácia do que os procedimentos eletroforéticos. O sistema automatizado é de fácil manuseio e os resultados são apresentados rapidamente. Entretanto, pequenas variações no tempo de eluição da coluna cromatográfica podem levar à identificação errada, pois a hemoglobina variante pode ser eluída em outra janela, como descrito em nossos resultados. Além disso,

algumas variantes não são eluídas em janelas próprias, como o caso das Hb Lepore ou Hb E. Dessa forma, é necessária a averiguação dos dados por meio de procedimentos eletroforéticos. Além disso, algumas variantes são eluídas na mesma janela que outras, como por exemplo a Hb Korle-Bu, que apresenta comportamento eletroforético idêntico à Hb D (eletroforese em pH alcalino e ácido e eletroforese de cadeias globínicas, pH alcalino) além de ser eluída na mesma janela (Hb D), diferindo apenas no tempo de retenção e no perfil cromatográfico, com desvio da linha de base. Faz-se assim necessária a utilização de técnicas ainda mais sensíveis para elucidação da suspeita e a associação de várias delas para o diagnóstico preciso.

A técnica de PCR é uma ferramenta na biologia molecular extremamente poderosa. Muitas mudanças têm sido introduzidas, melhorando-a cada vez mais e ampliando sua utilização. Aliada as endonucleases de restrição constituem um importante instrumento de análise, possibilitando a identificação acurada de inúmeras variantes. Os RFLP são definidos pela existência de fragmentos de restrição que diferem em tamanho após a ação dessas enzimas. A detecção de um RFLP, por si só, não revela informações sobre os mecanismos que geraram o alelo mutante, sendo necessários portanto, estudos mais aprofundados sobre tais mecanismos. Entretanto, sua presença pode, muitas vezes, ser utilizada como um marcador genético, ou como nesse estudo, para confirmação da mutação que leva à formação de variantes de hemoglobina.

Os alelos mutantes também podem ser identificados através da metodologia ASO na qual uma sonda é sintetizada, com comprimento ideal para permitir uma hibridação específica e diferencial, baseada na substituição de um único nucleotídeo. A hibridação ocorrerá apenas se a sonda e o DNA alvo forem totalmente complementares. A metodologia PCR-ASO é um teste rápido e específico, tornando-se um método útil para a análise genética.

Cada metodologia apresenta limitações na identificação das hemoglobinas anormais e a co-migração pode subestimar a frequência de algumas variantes (Moscoso et al., 1990). Portanto, a combinação de várias técnicas como a eletroforese em acetato de celulose, pH alcalino, eletroforese em gel de ágar, pH

ácido, focalização isoelétrica, eletroforese de cadeias globínica, HPLC e estudos moleculares parece ser necessária para a identificação acurada das hemoglobinas variantes (Clarke e Higgins, 2000; Wajcman, et al., 2001).

O estudo familiar também pode auxiliar no esclarecimento de heranças complexas, como a interação de Hb E, Hb Lepore e talassemia alfa (Viprakasit et al., 2002) ou excluir a homozigose para as variantes de hemoglobinas, como citado por Ozsoylu (1970) em que um indivíduo foi erroneamente diagnosticado como homozigoto para Hb D e posteriormente foi identificado como portador de Hb D e talassemia beta.

O correto diagnóstico laboratorial é de grande importância para as formas interativas de hemoglobinas, especialmente no Brasil, tendo em vista os inúmeros casos de associação de hemoglobinopatias, além de variantes que apresentam co-migração, como os casos aqui descritos de interação entre Hb D-Los Angeles e talassemia beta, Hb D-Los Angeles e Hb S ou Hb D-Los Angeles e Hb Lepore; todos esses casos podem ser erroneamente identificados como Hb D-Los Angeles ou Hb S em homozigose. A Hb Hasharon também apresenta migração semelhante a Hb S em pH alcalino enquanto a Hb E migra de forma semelhante à Hb C. A ocorrência de tais associações exige, portanto, que todos os recursos diagnósticos, em nível laboratorial sejam utilizados, em benefício do paciente e seus familiares. O esclarecimento diagnóstico destes casos é fundamental, tanto para o correto aconselhamento genético quanto para evitarem-se tratamentos inadequados ou desnecessários dos seus portadores.

O aconselhamento genético depende de um diagnóstico preciso e da definição da etiologia quando possível. Com base na história familiar, testes apropriados e conhecimento da literatura, faz-se uma estimativa do risco de recorrência. O processo de aconselhamento pode estender-se a outros membros da família, que estejam sob risco de desenvolver uma doença em questão ou ter filhos afetados. As decisões sobre ter filhos, usar medidas contraceptivas, fazer diagnóstico pré-natal devem ser tomadas pelos indivíduos envolvidos, com o auxílio do aconselhador. Os programas de triagem neonatal, para identificar

indivíduos portadores são um importante elemento dos programas de aconselhamento genético (Nora e Fraser, 1991).

Além disso, o diagnóstico pré-natal das hemoglobinopatias, como no caso da associação de Hb S e D pode ser realizado, resultando na continuidade da gravidez ou não, nos países em que o aborto é legalizado ou na adoção de medidas profiláticas precoces. Outra preocupação que deverá tomar lugar nos próximos anos será a análise em oócitos doados para métodos de reprodução assistida, uma vez que foi relatada a co-herança de Hb D-Los Angeles e Hb S em uma criança gerada a partir de oócito doado, fecundado com o espermatozóide do pai, portador de Hb S (Athanasίου-Metaxa et al., 2002).

Artigos originados



## **Avaliação eletroforética, cromatográfica e molecular da Hb D Los Angeles no Brasil.**

**Ana R. Chinelato-Fernandes<sup>1</sup>, Guilherme G. Leoneli<sup>2</sup>, Patrícia O. Calderan<sup>3</sup>,  
Rute B. Oliveira<sup>4</sup>, Wilson A. Silva Jr.<sup>5</sup>, Claudia A. Hidalgo<sup>6</sup>, Claudia R.  
Bonini-Domingos<sup>7</sup>**

- <sup>1</sup> *Laboratório de Hemoglobinas e Genética das Doenças Hematológicas. Mestre em Genética pelo programa de Pós-Graduação do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, UNESP – São José do Rio Preto - SP.*
- <sup>2</sup> *Mestre em Genética pelo programa de Pós-Graduação do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, UNESP – São José do Rio Preto - SP.*
- <sup>3</sup> *Farmacêutica Bioquímica, responsável pelo Laboratório de Hematologia da Faculdade de Farmácia, UNIC, Cuiabá – MT.*
- <sup>4</sup> *Bioquímica do Laboratório de Hematologia do Centro de Hematologia e Hemoterapia de Santa Catarina – Fundação de Apoio ao Hemosc e Cepon – Fahece.*
- <sup>5</sup> *Professor Doutor colaborador do Hemocentro de Ribeirão Preto – SP.*
- <sup>6</sup> *Mestre em Matemática Aplicada pelo Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, UNESP – São José do Rio Preto - SP.*
- <sup>7</sup> *Professora Doutora responsável pelo Laboratório de Hemoglobinas e Genética das Doenças Hematológicas, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, UNESP – São José do Rio Preto - SP.*

Endereço para correspondência:

Ana Regina Chinelato Fernandes  
IBILCE - UNESP  
R. Cristóvão Colombo, 2265  
CEP:15054-000  
São José do Rio Preto - SP  
Fone: (17) 2212392  
e-mail: [ar.chinelato@uol.com.br](mailto:ar.chinelato@uol.com.br)

## Resumo

A variante de hemoglobina (Hb) D mais comum, Hb D Los Angeles ou D Punjab, é originada de uma transversão GAAΠCAA no códon 121 da globina beta; essa mutação resulta na substituição do ácido glutâmico por glutamina na proteína. É a terceira variante de hemoglobina mais frequente da população brasileira. Como as hemoglobinas D apresentam migração similar à Hb S em pH alcalino, e como Hb A em pH ácido, são necessários vários testes para o correto diagnóstico.

No presente estudo objetivou-se relacionar os diferentes procedimentos laboratoriais de rotina diagnóstica, além da análise molecular, para estabelecer o perfil de Hb D-Los Angeles no Brasil.

Foram analisados 47 indivíduos da população brasileira com provável Hb D-Los Angeles, por vários procedimentos eletroforéticos em diferentes condições de pH, além da cromatografia líquida de alta pressão, e testes moleculares para confirmação da mutação.

Foram encontrados quatro tipos de combinações de hemoglobinas: 42 indivíduos portadores de hemoglobina AD-Los Angeles, dois indivíduos com doença de Hb S/D-Los Angeles, dois indivíduos com Hb D-Los Angeles e talassemia beta e um indivíduo com Hb D-Los Angeles e Hb Lepore. Os indivíduos heterozigotos para D-Los Angeles são assintomáticos, entretanto, em associação com outras variantes e talassemias podem apresentar graus variáveis de manifestações clínicas.

Os resultados apresentados enfatizaram a necessidade da associação de várias metodologias para a identificação da Hb D-Los Angeles, além de auxiliar na elucidação de combinações raras.

Palavras-chaves: Hemoglobina D-Los Angeles, Diagnóstico laboratorial, Hemoglobinopatias.

## **Electrophoretical, chromatographic and molecular valuation of Hb D Los Angeles in Brazil**

### **Abstract**

The most common Hb D variant, the Hb D-Los Angeles, also known as Hb D-Punjab, is originated through a GAA $\rightarrow$ CAA change at the 121 codon of the  $\beta$  globin gene; this mutation results in the replacement of glutamic acid for glutamine in protein. It is the third most common hemoglobin variant in Brazilian population. This variant has electrophoretic migration on alkaline pH similar to Hb S and identical migration to hemoglobin A in acidic pH. Thus, several techniques are necessary to the appropriate diagnosis.

The purpose of this trial was to relate the different laboratorial techniques and molecular analyses to determine the profile of Hb D-Los Angeles in Brazil.

Forty seven individuals from Brazilian population with Hb D-Los Angeles have been studied. Multiple electrophoresis in several experimental conditions have been carried out, in addition to high performance liquid chromatography (HPLC) and molecular analysis to confirm this mutation.

Four compound heterozygotes have been observed: 42 individuals heterozygous Hb AD-Los Angeles, 2 with Hb S/D-Los Angeles disease, 2 individuals with Hb D-Los Angeles and beta-thalassemia and 1 with Hb D-Los Angeles and Hb Lepore. The heterozygous hemoglobin D-Los Angeles is asymptomatic, even though its association with other variants and thalassemias may present variable degrees of clinical manifestations.

The results presented have emphasized the significance of association of different laboratorial techniques for the D-Los Angeles diagnosis, and have helped to elucidate rares combinations.

Keywords: Hemoglobin D-Los Angeles, Laboratorial diagnosis, Hemoglobinopathies.

## Introdução

As variantes de hemoglobinas foram estudadas extensivamente nos últimos anos. A hemoglobina D (Hb D) foi descoberta em 1951 por Itano e é a terceira variante de hemoglobina mais comum depois das hemoglobinas Hb S e Hb C<sup>(1, 2, 3)</sup>. A Hb D apresenta mobilidade eletroforética similar à Hb S em pH alcalino e na posição da Hb A em gel de ágar em pH ácido. A Hb D-Los Angeles, também conhecida como D-Punjab, é a mais comum das hemoglobinas D, sendo originada da transversão GAAΠCAA no códon 121, (éxon 3) do gene da globina beta. Essa mutação resulta na troca do ácido glutâmico por glutamina durante o processo de tradução<sup>(4)</sup>. Essa hemoglobina é descrita tanto em heterozigose como em homozigose, além da combinação com Hb S ou talassemias alfa ou beta<sup>(5)</sup>. Os indivíduos heterozigotos e homozigotos são assintomáticos enquanto os que apresentam associação com Hb S ou talassemia beta podem desenvolver anemia hemolítica de discreta à moderada<sup>(4)</sup>.

Apesar de ser possível a diferenciação pelos métodos eletroforéticos descritos acima, tais metodologias possuem limitações, uma vez que algumas variantes apresentam comportamento eletroforético similar, por possuir propriedades bioquímicas e/ou funcionais muito semelhantes, como é o caso das hemoglobinas D e S em pH alcalino<sup>(2, 3, 4, 6, 7)</sup>. Desse modo, além da eletroforese alcalina são necessários testes confirmatórios para o correto diagnóstico, como eletroforese ácida, cromatografia líquida de alta pressão (HPLC), focalização isoeétrica (IEF), eletroforese de cadeias globínicas e a utilização de técnicas de biologia molecular, como a reação em cadeia da polimerase (PCR), análise dos fragmentos de restrição de diferentes tamanhos (RFLP) e sequenciamento<sup>(8)</sup>.

No presente estudo objetivou-se relacionar os diferentes procedimentos laboratoriais de rotina diagnóstica, além da análise molecular, para estabelecer o perfil de Hb D-Los Angeles no Brasil.

## Material e Métodos

Foram analisadas 47 amostras de sangue periférico, sendo 19 provenientes de indivíduos do sexo masculino e 28 do sexo feminino, com idades que variaram de recém nascidos até 58 anos. Essas amostras, oriundas de sete estados do Brasil – RS, SC, SP, RJ, MT, MS e SE, foram enviadas ao Laboratório de Hemoglobinas e Genética das Doenças Hematológicas – UNESP. O sangue foi coletado em frasco estéril com anticoagulante EDTA 5%, após consentimento informado. Para a determinação dessa variante, foram realizados testes de triagem, que consistiram de resistência globular osmótica em NaCl a 0,36%<sup>(9)</sup>, análise da morfologia eritrocitária à fresco<sup>(10)</sup> e eletroforese alcalina em acetato de celulose utilizando-se tampão Tris-EDTA-borato em pH 8,5<sup>(11)</sup>. Como procedimento de confirmação, foram realizadas as eletroforeses em ágar com tampão fosfato pH 6,2<sup>(12)</sup>; de cadeias globínicas em acetato de celulose com tampão Tris-EDTA-borato, uréia e mercaptoetanol<sup>(13)</sup>; focalização isoeletrica em gel de agarose<sup>(14)</sup> e cromatografia líquida de alta pressão (HPLC), com o equipamento VARIANT (BIO-RAD), utilizando-se o kit de diagnóstico para talassemia beta heterozigota.

Para as análises moleculares, o DNA foi obtido dos glóbulos brancos através do método de extração fenólica<sup>(15)</sup> e o éxon 3 da globina beta foi amplificado através da reação em cadeia da polimerase<sup>(16)</sup>. A sequência de primers utilizada na reação de amplificação foi: Primer sense - CD1 5' TGC CTC TTT GCA TTC TA 3' e Primer anti-sense – CD2 5'TAG AAT GGT GCA AAG AGG CA 3'. Do produto amplificado, cinco microlitros foram digeridos com a endonuclease de restrição *EcoRI* de acordo com as instruções do fabricante e o produto da digestão submetido à eletroforese em gel de poli-acrilamida para observação das bandas mutantes e/ou normais. O códon 121 apresenta um sítio de digestão para a enzima *EcoRI* no alelo normal, que é excluído no mutante D-Los Angeles, permitindo a análise por PCR-RFLP. A digestão do alelo normal gera produtos de 296pb e 268pb enquanto que o alelo mutante apresenta uma única banda de 564pb. Os casos duvidosos foram submetidos a reação de

sequenciamento<sup>(17)</sup>. Na presença de associação com outras variantes ou talassemias, foram realizados testes moleculares por PCR-ASO, com kits *mD<sub>x</sub>* (BIO-RAD) para confirmação.

## Resultados

Os resultados obtidos nos procedimentos de triagem e testes subsequentes dos indivíduos investigados com suspeita de serem portadores de hemoglobina D-Los Angeles estão relacionados na tabela 1. Dos indivíduos analisados, 80% apresentaram resultado negativo quanto à resistência osmótica em NaCl 0,36%. Alterações discretas quanto à morfologia eritrocitária foram descritas na maioria dos indivíduos. O perfil eletroforético dos heterozigotos, com uma fração hemoglobínica na posição de Hb A e outra semelhante à Hb S foi encontrado na maior parte dos casos, com exceção de cinco amostras, que apresentaram perfil homozigoto para Hb S; três amostras com presença de Hb F e uma amostra com padrão homozigoto para Hb S além da presença de Hb F. A presença de Hb F e valores baixos de Hb A e da fração semelhante à Hb S na amostra AR-136 já era esperada por se tratar de um recém-nascido. Alguns indivíduos, apesar de adultos também apresentaram frações na posição de Hb F. As doze amostras com presença de Hb H em eletroforese alcalina foram investigadas por metodologias específicas, apresentando resultados negativos para talassemia alfa. Em algumas amostras não foi possível a realização dos testes de resistência osmótica e morfologia eritrocitária devido à pequena quantidade de material enviado.

Nas análises eletroforéticas em pH ácido, a maioria das amostras apresentou perfil eletroforético de Hb AA, sugerindo variante do tipo D. Cinco amostras apresentaram uma fração na faixa de Hb F e duas amostras o padrão de “doença de Hb S/D”, ou seja, perfil homozigoto para Hb S em pH alcalino e do heterozigoto AS em pH ácido. Todas as amostras analisadas apresentaram perfil eletroforético similar à Hb D em pH alcalino e ácido, e confirmadas como mutantes de cadeia beta pelo procedimento específico de análise de cadeias globínicas. Inúmeras variantes apresentam o padrão de migração similar as hemoglobinas do tipo D; entretanto, muitas são mutantes de cadeia alfa. Desse modo, a utilização da eletroforese de cadeias globínicas foi necessária para a identificação dessas variantes como do tipo D. É possível diferenciar a Hb G

Philadelphia, que é um mutante de cadeia alfa da Hb Korle-Bu, mutante de cadeia beta. Ainda assim, não seria possível a identificação entre Hb D-Los Angeles e Hb Korle-Bu, pois as duas variantes apresentam as frações mutantes com o mesmo padrão de migração.

Na tabela 2 encontram-se os dados da análise por HPLC com o kit de diagnóstico para talassemia beta heterozigota (BTS) e equipamento VARIANT (BIO-RAD). Esse sistema identifica as Hb A<sub>2</sub> e F como padrões quantitativos e permite a determinação das hemoglobinas variantes mais comuns, como as Hb S, C, D e E, em seis minutos de análise por amostra de sangue. A identificação dessas variantes é baseada em tempos de retenção específicos em coluna de cromatografia de troca iônica, identificadas em “janelas” previamente estabelecidas pelo sistema. Algumas amostras apresentaram pequenas frações de hemoglobinas identificadas como “desconhecidas” (Desc. 1, 2 e 3) pelo aparelho. Essas frações possivelmente são decorrentes de arrastes de amostras anteriores. Três amostras que na eletroforese alcalina apresentaram uma fração pequena de Hb F, mostraram valores percentuais aumentados dessa hemoglobina quando avaliadas por HPLC. Os valores médios de Hb A<sub>0</sub> estão próximos de 50%. Para a Hb A<sub>2</sub>, a grande maioria das amostras analisadas apresentaram valores abaixo da normalidade. Alguns indivíduos entretanto, apresentaram valores mais elevados, com destaque para a amostra AR-156. Os valores da Hb A<sub>2</sub> e Hb D dessa amostra tomados juntos, associados à outros procedimentos de análise, indicam a interação entre Hb D-Los Angeles e Hb Lepore. Fato que merece destaque diz respeito a algumas amostras que migraram na janela de Hb S, apesar dos procedimentos anteriores indicarem a presença de Hb D. Nota-se entretanto, que os valores do tempo de retenção encontrados nessas amostras - 4,34; 4,35 e 4,36 - estão próximos ao limite máximo estabelecido pelo fabricante para a janela de Hb D (4,33) e próximos ao limite inferior da janela de Hb S. Destaca-se também o valor percentual da amostra AR-199 (87,6) na janela de Hb S, que sugere a interação de Hb D e talassemia beta heterozigota. Na janela de Hb D os valores percentuais médios estão próximos de 35%, com algumas exceções, como as amostras AR-010, AR-136 e AR-216 que apresentaram valores mais baixos. A amostra AR-

131 apresentou valor elevado nessa janela, sugerindo a presença de Hb D e talassemia beta heterozigota e quatro amostras apresentaram pequenas frações de Hb C, que podem ser consideradas arrastes de amostras anteriormente analisadas pelo aparelho. Os valores de tempo de retenção foram estabelecidos entre 4,1 – valor mínimo e 4,32 – valor máximo.

Após esses procedimentos, foram realizadas as confirmações moleculares para Hb D Los Angeles, por amplificação do éxon 3 pelo método de PCR e análise dos fragmentos após digestão com a enzima *EcoRI*. Todas as amostras testadas apresentaram 3 fragmentos: 2 que constituem o alelo normal, com 296pb e 268pb, que foi clivado pela enzima, e outro fragmento de 564pb resultante do alelo mutante. A mutação na primeira base da trinca, na posição 121 retira o sítio específico para essa enzima; dessa forma, não há o reconhecimento de nenhum local para digestão pela enzima *EcoRI*. A figura 1 mostra um esquema do padrão de migração dos fragmentos após a digestão.

Dez amostras foram caracterizadas por PCR e sequenciamento automático em ABI, para confirmação da mutação.

Os casos com interações, como Hb D-Los Angeles e talassemia beta e Hb S e D-Los Angeles foram confirmados com a utilização da metodologia PCR-ASO, que possui sensibilidade para discriminar 16 mutantes de talassemia beta e as hemoglobinas variantes S e C.

Desse modo, dos 47 indivíduos analisados, 42 apresentaram o padrão heterozigoto para Hb D-Los Angeles, dois indivíduos o padrão Hb S e D-Los Angeles, dois indivíduos com o padrão Hb D-Los Angeles e talassemia beta e um indivíduo com Hb D-Los Angeles e Hb Lepore.

## Discussão

A Hb D-Los Angeles ou D-Punjab foi primeiramente descrita por Itano em 1951 em uma família residente em Los Angeles, descendente de ingleses e indianos<sup>(1)</sup>. Em 1962, sua estrutura química foi caracterizada como sendo uma substituição do ácido glutâmico por glutamina na globina beta. Apesar dessa variante possuir uma ampla distribuição mundial, seu maior reservatório encontra-se no sub-continente indiano. Estima-se que 3% da população na região de Punjab, na Índia, seja portadora heterozigota dessa variante<sup>(20,21)</sup>. Na América Latina, essa hemoglobina foi descrita no Brasil, Argentina, Cuba, Guadalupe, Jamaica, Venezuela e México<sup>(4)</sup>. Em nosso país, a Hb D-Los Angeles, é terceira variante mais comum, após as Hb S e Hb C<sup>(5,10)</sup>.

A eletroforese de hemoglobinas em acetato de celulose, pH alcalino é o método mais usado para a identificação de hemoglobinas; entretanto, sua sensibilidade é limitada, especialmente nos casos de co-migração de isoformas, como as hemoglobinas S, D, G e Korle-Bu, dificultando o diagnóstico adequado. As eletroforeses ácida e de cadeias globínicas podem auxiliar na diferenciação, porém, também apresentam limitações. Através da eletroforese em gel de ágar, pH ácido, pode-se diferenciar as Hb S do tipo D, uma vez que as Hb tipo D migram de forma semelhante à Hb A neste pH. As Hb G e Korle-Bu apresentam o mesmo comportamento eletroforético da Hb D-Los Angeles nesses procedimentos eletroforéticos. Com a utilização da eletroforese de cadeias globínicas, pH alcalino, é possível a diferenciação das Hb D (mutante de cadeia beta) e Hb G-Philadelphia, que é um mutante de cadeia alfa. As Hb D e Hb Korle-Bu poderão ser diferenciadas molecularmente, uma vez que apresentam os mesmos padrões de migração nos vários procedimentos eletroforéticos, incluindo a eletroforese de cadeias globínicas. Na cromatografia líquida de alta pressão (HPLC), a Hb Korle-Bu é eluída na janela de Hb D, porém com desvio da linha de base.

As amostras avaliadas apresentaram migração semelhante à Hb S em pH alcalino, como Hb A em pH ácido e uma banda na posição de mutante de

cadeia beta na eletroforese de cadeias globínicas em pH alcalino, conforme relatos da literatura para este mutante<sup>(2,22)</sup>. Entretanto, faz-se necessária a utilização de técnicas mais sensíveis para a correta caracterização dessa variante.

O uso do HPLC para análise de hemoglobinas tem aumentado nos últimos anos<sup>(23)</sup>. Entretanto, o equipamento foi padronizado para a população norte americana; desse modo, torna-se necessária a padronização dos resultados normais e de hemoglobinas variantes para a população brasileira, além do estabelecimento dos padrões para cada laboratório. Para a Hb A<sub>2</sub>, a grande maioria das amostras analisadas apresentaram valores abaixo da normalidade. Huisman<sup>(18)</sup>, encontrou quantidades elevadas de Hb A<sub>2</sub> em indivíduos portadores de hemoglobinas do tipo D. Em nossos achados, a maior parte das amostras apresentaram valores abaixo dos considerados normais, fato também mencionado por Dash<sup>(19)</sup>. Esses dados discordantes na literatura talvez possam ser explicados pelo uso de colunas ou sistemas de eluição diferentes<sup>(18)</sup>. Com relação à hemoglobina D, em nossos achados, foi encontrado o tempo de retenção médio de 4,24, com mínimo de 4,1 e máximo de 4,32, portanto, dentro dos limites estabelecidos pelo fabricante que são: mínimo de 3,91 e máximo de 4,33.

Fato que mereceu destaque foi o de algumas amostras eluídas na janela de Hb S. Nota-se, entretanto, que os valores do tempo de retenção dessas amostras foram de 4,34, 4,35 e 4,36. Esses valores encontram-se muito próximos ao valor máximo estabelecido pelos fabricantes para a janela de Hb D, que foi de 4,33, e próximas ao valor mínimo para Hb S, que também é de 4,33. Se apenas o HPLC fosse utilizado para a caracterização dessa variante, provavelmente, tais amostras seriam identificadas como Hb S. Além disso, os valores da porcentagem das amostras AR-131 (88,8%) na janela de Hb D e AR-199 (87,6%) na janela de Hb S poderiam mimetizar uma homozigose para as hemoglobinas citadas. Entretanto, nessas condições, os níveis de Hb D costumam estar próximos à 95%<sup>(22)</sup>. Os perfis eletroforéticos auxiliaram a elucidação destes casos, destacando-se a importância da utilização de metodologias clássicas aliadas à técnicas de maior sensibilidade, como HPLC, na avaliação de hemoglobinas do Brasil.

Após a amplificação por PCR e digestão enzimática com a endonuclease de restrição *EcoRI*, as amostras de DNA analisadas apresentaram os fragmentos correspondentes ao alelo mutante para Hb D-Los Angeles e ao normal. Esses achados confirmam a presença de Hb D-Los Angeles em todas as amostras e excluem definitivamente a homozigose das amostras AR-131 e AR-199. A presença do alelo anormal nas amostras G-005, G-006, G-032, G-034, G-035, G-036, G-103, G-104, G-107, G-108 foi confirmada após sequenciamento.

A metodologia PCR-ASO foi utilizada para confirmação nos casos em que havia interação de Hb D-Los Angeles com outras variantes, como a Hb S ou talassemias, com exceção da amostra AR-156. Assim, na amostra AR-131 foram confirmadas as mutações CD-39 e CD6-A e na amostra AR-199 a mutação CD-39 para talassemia beta; na amostra AR-208, a presença do alelo beta S, originando um duplo heterozigoto S/D-Los Angeles. Para o indivíduo (S/D-Los Angeles) G-108, a confirmação foi realizada através de sequenciamento.

A Hb D-Los Angeles foi descrita tanto em heterozigose como em homozigose, assim como em combinação com Hb S ou talassemias alfa ou beta<sup>(4,22,24)</sup>. Os indivíduos heterozigotos são assintomáticos; em homozigose podem apresentar diminuição da fragilidade osmótica, células em alvo e níveis de hemoglobina A<sub>2</sub> normais, mas é uma situação rara. A co-herança de Hb D e talassemia beta é pouco descrita na literatura mundial<sup>(22)</sup>. Os portadores de Hb D e talassemia beta apresentam anemia hemolítica de leve à moderada<sup>(4,6,22)</sup>. Os indivíduos portadores da associação entre Hb S e D, chamada doença de Hb S/D, podem apresentar anemia hemolítica de leve à severa e clínica similar aos pacientes com anemia falciforme<sup>(4,6)</sup>. Embora a Hb D não sofra falcização, o fenótipo severo associado à doença de Hb S/D pode ser devido a um aumento na polimerização da Hb S, que é facilitado pela mutação no códon 121<sup>(7,22)</sup>.

## **Conclusões**

Cada metodologia utilizada para a identificação das variantes de hemoglobinas apresenta limitações. Desse modo, faz-se necessária uma associação de técnicas clássicas e estudos moleculares para sua identificação. Dependendo da região do país analisada podemos encontrar diferentes frequências para determinadas hemoglobinopatias, uma vez que algumas delas estão relacionadas à origem européia ou africana da população fundadora. Os valores dessas frequências não estão ainda bem estabelecidos no nosso país. Além disso, com o aumento na utilização do HPLC para o estudo das hemoglobinopatias, será possível estabelecer um parâmetro para a população brasileira das diferentes frações de hemoglobinas. O presente estudo poderá auxiliar na identificação da Hb D-Los Angeles, através dos resultados apresentados, além de auxiliar na elucidação de associações raras.

O perfil para Hb D-Los Angeles, pelas amostras avaliadas mostrou fração na faixa de Hb S em eletroforese pH alcalino, como Hb A em eletroforese pH ácido e na posição de mutante de cadeia beta na eletroforese de cadeias globínicas em pH alcalino; a morfologia eritrocitária foi discreta e a resistência osmótica, na maioria dos casos negativa. Por HPLC a fração de Hb D situa-se em uma janela de tempo de retenção que varia de 4,1 a 4,32 e com média percentual de 35,44%, sendo a fração de Hb A<sub>2</sub> diminuída na maioria dos casos.

## **Referências Bibliográficas**

1. Vella, F.; Lehmann, H. Haemoglobin D Punjab (D Los Angeles). **J. Med. Genet.**, 1974. 11: 341-8.
2. Politis-Tsegos, C. et al. Homozygous haemoglobin D Punjab. **J. Med. Genet.**, 1975. 12: 269-74.
3. El-Kalla, S.; Mathews, A.R. Hb D-Punjab in the United Arab Emirates. **Hemoglobin**, 1997. 21: 369-75.
4. Perea, F.J. et al. Hb D-Los Angeles associated with Hb S or  $\beta$ -thalassaemia in four Mexican mestizo families. **Hemoglobin**, 1999. 23: 231-7.
5. Leoneli, G.G. **Hemoglobina D – Caracterização eletroforética e molecular**. 2001.107f. Dissertação (Mestrado em Genética). Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas – UNESP, São José do Rio Preto-SP.
6. Fodor, F.H.; Eng, C.M. Molecular exclusion of haemoglobin S D disease by prenatal diagnosis. **Prenat. Diagn.**, 1999. 19: 58-60.
7. Worthington, S.; Lehmann, H. The first observation of Hb D Punjab  $\beta$ 0 thalassaemia in a English family with 22 cases of unsuspected  $\beta$ 0 thalassaemia minor among its members. **J. Med. Genet.**, 1985. 22: 377-81.

8. Schnee, J. et al. Hb D Los Angeles (D-Punjab) and Hb Presbyterian: analysis of the defect at the DNA level. **Hum. Genet.**, 1990. 84: 365-7.
9. Silvestroni, E.; Bianco, I. Screening for microcytemia in Italy: analysis of data collected in the past 30 years. **Am. J. Hum. Genet.**, 1975. 27: 198-212.
10. Bonini-Domingos, C.R. **Prevenção das hemoglobinopatias no Brasil - Diversidade Genética e Metodologia Laboratorial.** 1993. 144f. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Biociências, Letras e Ciência Exatas, Universidade Estadual Paulista – UNESP, São José do Rio Preto-SP.
11. Marengo-Rowe, A.J. Rapid electrophoresis and quantitation of haemoglobin on cellulose acetate. **J. Clin. Path.**, 1965. 18: 790-2.
12. Vella, F. Acid agar gel electrophoresis of human hemoglobin. **Am. J. Clin. Path.**, 1968. 49(3): 440-2.
13. Schneider, R.G. Differentiation of electrophoretically hemoglobins - such as S, D ou G and P or A<sub>2</sub>, C, E and O – by electrophoresis of the globin chains. **Clin. Chem.**, 1974. 20: 1111-5.
14. Naoum, P.C. **Eletroforese - Técnicas e Diagnósticos.** 2<sup>a</sup> edição. Santos Livraria Editora, 1999. 154 p.

15. Pena, S.D.J. et al. DNA bioprints: simple non-isotopic DNA fingerprints with biotinylated probes. **Electrophoresis**, 1991. 12: 146-52.
16. Saiki, R. K et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science**, 1988. 230: 487-91.
17. Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R. DNA sequencing with chain – terminating inhibitors. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, 1977. 74: 5463-7.
18. Huisman, T.H.J. Combinations of  $\beta$  chain abnormal hemoglobins with each other or with  $\beta$ -thalassemia determinants with known mutations: influence on phenotype. **Clin. Chem.**, 1997. 43: 1850-6.
19. Dash, S. Hb A2 in subjects with Hb D. **Clin. Chem.**, 1998. 44: 2381-2.
20. Zeng, Y. et al. Identification of Hb D-Punjab gene: application of DNA amplification in the study of abnormal hemoglobins. **Am. J. Hum. Genet.**, 1989. 44: 886-9.
21. Fioretti, G. et al. DNA polymorphisms associated with Hb D-Los Angeles [ $\beta$  121 (GH4)GLU  $\Pi$  GLN] in Southern Italy. **Hemoglobin**, 1993. 17: 9-17.

22. Ahmed, M. et al. The  $\beta$ -globin genotype E121Q/W15X (cd121GAA $\Pi$ CAA/cd15TGG $\Pi$ TGA) underlines HbD/ $\beta$ -(0) thalassaemia marked by domination of haemoglobin D. **Ann. Hematol.**, 2001. 80: 629-33.
23. Riou, J. et al. Cation-exchange HPLC evaluated for presumptive identification of hemoglobin variants. **Clin. Chem.**, 1997. 43: 34-9.
24. Ozsoylu, S. Homozygous hemoglobin D Punjab. **Acta Haemat.**, 1970. 43: 353-9.

Tabela 1: Resultados obtidos dos procedimentos de triagem inicial e testes subsequentes (eletroforese ácida e de cadeias globínicas) nos indivíduos com suspeita de serem portadores de Hb D-Los Angeles

Amostras	Resistência Osmótica <sup>1</sup>	Morfologia Eritrocitária <sup>2</sup>	Eletroforese Alcalina <sup>3</sup>	Eletroforese Ácida <sup>4</sup>	Cadeias globínicas <sup>5</sup>
AR-010	Negativo	N/+	AS	AA	Beta
AR-031	Negativo	N/+	AS	AA	Beta
AR-033	Negativo	+	AS	AA	Beta
AR-035	Negativo	N/+	AS	AA	Beta
AR-037	Positivo	N/+	AS	AA	Beta
AR-040	Negativo	N/+	AS	AA	Beta
AR-060	Negativo	N/+	ASH	AA	Beta
AR-121	Negativo	+	AS	AA	Beta
AR-130	Negativo	N/+	ASH	AA	Beta
AR-131	Positivo	+	SS	AA	Beta
AR-134	--*	--*	AS	AA	Beta
AR-135	Positivo	N/+	ASH	AA	Beta
AR-136	Positivo	N/+	AdimFS	AF	Beta
AR-137	Positivo	+	ASH	AA	Beta
AR-156	Negativo	++	SS	AA	Beta
AR-163	Negativo	N/+	AS	AA	Beta
AR-171	Negativo	N/+	AS	AA	Beta
AR-180	Negativo	+	AS	AA	Beta
AR-196	Negativo	N/+	AS	AA	Beta
AR-199	Positivo	+/>++	AS	AA	Beta
AR-200	Negativo	N/+	ASH	AA	Beta
AR-201	Negativo	N/+	ASH	AA	Beta
AR-208	Positivo	+/>++	SSF	AS	Beta
AR-209	Negativo	N/+	AS	AA	Beta
AR-212	Negativo	N/+	AFSH	AA	Beta
AR-213	Negativo	N/+	AS	AA	Beta
AR-216	Negativo	N/+	AS	AA	Beta
AR-217	Negativo	N/+	AS	AA	Beta
AR-218	Negativo	N/+	AS	AA	Beta
AR-219	Negativo	N/+	AS	AA	Beta
AR-221	Negativo	+	ASH	AA	Beta
AR-234	Positivo	++	AS	AA	Beta
AR-236	Positivo	++	ASH	AA	Beta
AR-237	Negativo	N/+	AS	AA	Beta
AR-238	Negativo	+	ASH	AA	Beta
AR-239	Negativo	+	ASH	AA	Beta
AR-240	Negativo	+/>++	ASF	AF	Beta
G-005	Negativo	N/+	AS	AF	Beta
G-006	Negativo	+	ASH	AF	Beta
G-032	Negativo	N/+	AS	AA	Beta
G-034	Negativo	N/+	AS	AA	Beta
G-035	Negativo	+/>++	AS	AA	Beta
G-036	Negativo	N/+	AS	AA	Beta
G-103	Negativo	+	AS	AA	Beta
G-104	Negativo	+	ASF	AF	Beta
G-107	Negativo	--*	SS	AF	--*
G-108	--*	--*	SS	AS	--*

Tabela 2: Porcentagens e tempos de retenção das hemoglobinas de parte dos indivíduos da tabela 1 amostrados por HPLC

Amostras	Desc. 1*		F		P2		P3		A0		A2		S		D		C		Desc. 2*		Desc.3*	
	%	TR	%	TR	%	TR	%	TR	%	TR	%	TR	%	TR	%	TR	%	TR	%	TR	%	TR
AR-010					6,7	1,3	3,7	1,7	74,4	2,4	2,4	3,64			13,1	4,18						
AR-031	2,8	2,1	0,7	1,1	3,9	1,3	3,4	1,7	50	2,6	2,2	3,64			36,7	4,28						
AR-033					4,2	1,3	4,5	1,7	55,2	2,4	1	3,67			35,3	4,17						
AR-035			0,8	1,1	3,2	1,3	4,4	1,7	54,9	2,4	1,1	3,68			35,7	4,18						
AR-037	0,8	1	0,8	1,1	7,1	1,3	12	1,7	37,5	2,5					40,2	4,32			3,8	2,9		
AR-040					3,6	1,3	3,3	1,7	55,3	2,4	1	3,67			37,1	4,17						
AR-060	2,3	2,1	1,1	1,1	3,5	1,3	6,3	1,7	49,6	2,5	1,5	3,64			36	4,2						
AR-121	2,10	2,03	0,10	0,95	3,70	1,30	2,70	1,66	50,50	2,64	2,20	3,64			38,80	4,32						
AR-130	0,70	1,44	0,30	0,94	3,80	1,32	5,30	1,65	51,20	2,60	1,90	3,65			33,90	4,29			2,70	2,05		
AR-131	0,60	1,22	1,50	1,11			0,20	1,70	4,10	2,06	3,50	3,68			88,80	4,30			0,10	2,51	1,20	2,90
AR-135	2,40	2,06	2,00	1,12	3,80	1,31	3,00	1,71	52,40	2,66	2,80	3,65			31,50	4,28	2,10	5,18				
AR-136	0,40	2,06	59,70	1,23			1,30	1,66	19,80	2,62					12,20	4,20						
AR-137	2,00	2,06	0,70	1,13	3,60	1,32	4,10	1,66	56,80	2,64	2,20	3,64			30,80	4,29						
AR-156	0,70	2,74	2,80	1,10			0,70	1,63	4,40	2,05	12,0 0	3,49			79,40	4,30						
AR-163	1,80	2,08	0,60	1,13	2,90	1,34	2,50	1,70	49,90	2,64	1,10	3,68			41,20	4,31						
AR-171	2,30	2,08	0,20	1,12	3,60	1,34	2,50	1,74	53,60	2,64	2,00	3,68			35,70	4,30						
AR-180	2,00	2,08	0,70	1,12	4,00	1,34	2,40	1,74	57,20	2,68	1,90	3,68			31,80	4,30						
AR-196	0,20	0,94	0,70	1,11	3,00	1,30	4,70	1,64	49,70	2,64	2,00	3,63			36,80	4,31			0,50	1,43	2,20	2,02
AR-199	0,90	1,20	1,20	1,10			0,20	1,67	4,50	2,02	3,60	3,64	87,60	4,34					0,10	2,44	1,60	2,72
AR-200	2,20	2,04			3,80	1,31	2,20	1,70	50,40	2,71	2,20	3,65	38,10	4,35			1,30	5,22				
AR-201	1,70	2,03	0,40	1,10	2,90	1,31	1,80	1,70	51,00	2,70	2,30	3,66	40,00	4,36								
AR-208	1,70	2,32	5,40	1,11					2,10	2,04	3,80	3,64	48,20	4,58	37,70	4,30						
AR-209	0,30	0,94	1,70	1,10	3,30	1,30	6,40	1,65	49,00	2,60	2,40	3,62			33,50	4,26			0,70	1,44	2,70	2,04
AR-212	1,10	2,04	23,70	1,17			4,80	1,66	38,00	2,66	1,60	3,62			29,20	4,26						
AR-213	0,30	0,94	0,80	1,22	2,10	1,31	5,60	1,64	49,40	2,67	1,90	3,64	36,50	4,34					0,80	1,12	0,60	1,44
AR-216			1,60	1,06	4,50	1,29	6,30	1,78	64,90	2,64	6,30	3,80			16,20	4,12						
AR-217			1,40	1,06	4,40	1,29	6,30	1,76	65,10	2,65	7,20	3,76			14,60	4,10	0,90	5,28				
AR-218	2,50	2,00			5,20	1,29	2,80	1,67	50,90	2,64	2,10	3,59			36,50	4,30						
AR-219			1,30	1,06	4,40	1,29	6,40	1,77	65,30	2,64	6,10	3,77			16,40	4,11						
AR-221	2,20	2,04			4,30	1,32	2,00	1,68	47,70	2,65	2,20	3,62			41,60	4,25						
AR-234	1,70	2,04	0,30	1,12	3,30	1,31	1,90	1,69	54,80	2,63	2,00	3,61			35,90	4,25						
AR-236	2,80	2,10	2,80	1,13	4,00	1,34	3,10	1,71	51,00	2,56	2,30	3,67			34,10	4,21						
AR-237	0,50	1,12	0,70	1,24	2,50	1,34	1,90	1,70	46,70	2,56	2,30	3,69			42,80	4,26			2,60	2,09		
AR-238	2,40	2,15	1,30	1,15	3,00	1,38	1,80	1,74	50,10	2,58	1,80	3,72			39,50	4,24						
AR-239			0,40	1,15	3,20	1,37	2,40	1,72	56,70	2,56	1,90	3,71			35,40	4,22						
AR-240			34,90	1,22			3,10	1,74	38,00	2,56	1,20	3,71			22,80	4,21						
G-006	2,30	1,22	4,60	1,09	3,00	1,34	7,60	1,67	49,90	2,48					31,50	4,15	1,50	1,93				
G-032	3,00	2,08			4,10	1,33	5,20	1,66	49,40	2,43	1,30	3,62			37,10	4,18						
G-034			1,10	1,07	2,90	1,33	2,30	1,68	53,30	2,42	1,70	3,63			39,00	4,18						
G-035			1,40	1,24	2,50	1,34	4,30	1,68	53,60	2,44	1,30	3,66			37,00	4,21						
G-036					4,20	1,34	4,50	1,68	54,60	2,44	1,30	3,66			35,50	4,20						
<b>Média</b>	1,6		4,77		3,8		3,7		46,9		2,62		50,1		35,4		1,5		1,41		1,7	
<b>DP</b>	0,9		12,1		1		2,2		16,67		2,1		21,5		14,4		0,5		1,41		0,8	
<b>Min</b>		0,9		0,9		1,3		1,6		2		3,49		4,34		4,1		1,93		1,1		1,4
<b>Máx</b>		2,7		1,2		1,4		1,8		2,7		3,8		4,58		4,32		5,28		2,9		2,9

## Legenda da Tabela 1

\*-- Não foi possível a realização do teste.

1. Nas amostras com resistência normal à hemólise, visualizam-se as linhas negras da folha posicionada atrás dos tubos (resultado negativo). Nas amostras com resistência aumentada, tais linhas não são visíveis (resultado positivo).
2. Células normais (N), com alterações discretas (+), alterações moderadas (++), alterações acentuadas (+++) e intermediárias (N/+), (+/+++), (++/+++).
3. Padrão normal: AA; padrão alterado: diferente de AA.
4. Padrão normal: AA; padrão alterado: diferente de AA.
5. Padrão normal: cadeias normais; padrão alterado: cadeias alfa, beta, delta, gama, delta/beta.

## Legenda da Tabela 2

Desc. 1, 2 e 3: Janelas de hemoglobinas identificadas como desconhecidas;

F: Janela de Hemoglobina Fetal;

P2: Janela de Hemoglobina A glicosilada;

P3: Janela de Hemoglobina A acetilada;

A0: Janela de Hemoglobina A;

A2: Janela de Hemoglobina A<sub>2</sub>;

S: Janela de Hemoglobina S;

D: Janela de Hemoglobina D;

C: Janela de Hemoglobina C;

%: Porcentagem de cada hemoglobina presente na amostra;

TR: Tempo de retenção é o tempo transcorrido da injeção da amostra até o ápice do pico de hemoglobina, sendo específico para cada hemoglobina.

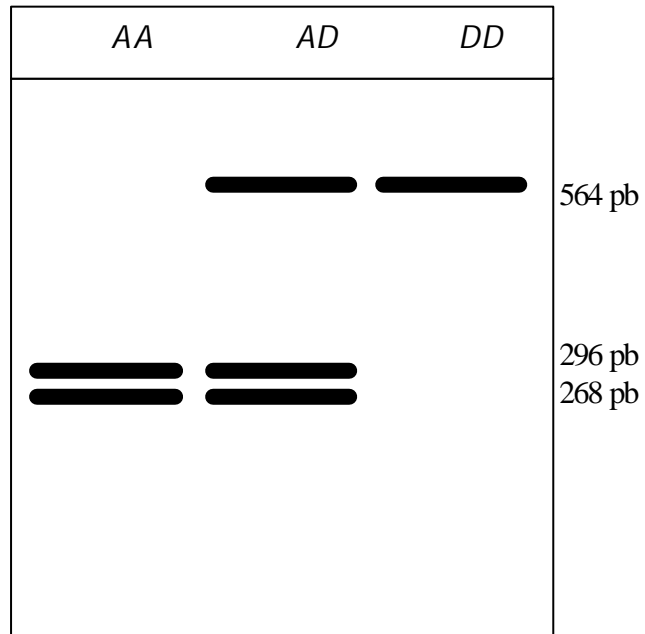


Figura 1: Esquema ilustrando os padrões de migração dos fragmentos obtidos após a digestão com a endonuclease de restrição *Eco RI*.

Este artigo será submetido à Clinical Chemistry

ISSN 0009-9147

## **Association of the Hb D-Los Angeles and beta-thalassemia identified by molecular evaluation.**

Chinelato-Fernandes, A.R.<sup>1</sup>, Antunes, R.N.S.<sup>2</sup>, Bonini-Domingos, C.R.<sup>3</sup>

*1. Laboratory of Hemoglobins e Genetics of Hematological Diseases. M. Sc. in Genetics from the Post-Graduation program of the Institute of Biosciences, Letters and Exact Sciences, UNESP [São Paulo State University] – São José do Rio Preto – SP, Brazil.*

*2. Assistant Medical Doctor of the Marília Medical School, Marília-SP, Brazil. Professor at the Medical School of Marília University (UNIMAR).*

*3. Professor (Ph.D.) in charge of the Laboratory of Hemoglobins and Genetics of the Hematological Diseases of the Institute of Biosciences, Letters and Exact Sciences, UNESP [São Paulo State University] – São José do Rio Preto - SP.*

Running title: H D-Los Angeles and beta thalassemia association

Corresponding author:

Ana Regina Chinelato Fernandes

IBILCE – UNESP R. Cristóvão Colombo, 2265

CEP:15054-000 São José do Rio Preto - SP

Phone: 55 (17) 2212392

Fax: 55 (17) 224 6355

e-mail: [ar.chinelato@uol.com.br](mailto:ar.chinelato@uol.com.br)

## **Abstract**

**Background:** Hemoglobinopathies may result from regulatory or structural alterations in globin genes, originating quantitative unbalance of the synthesized chains, known as thalassemias or variant hemoglobins. Since these alterations may affect any of the globin chains forming the functional tetramer, it is possible to find associations between them, such as Hb D-Los Angeles and beta thalassemia, two beta globin chain alterations. A family under suspicion of mutant hemoglobin association has been investigated for confirmation of these alterations diagnosis.

**Methods:** Peripheral blood samples analyzed by electrophoresis in cellulose acetate, alkaline pH, electrophoresis in acid agar gel, globin chain electrophoresis and high performance liquid chromatography - HPLC have been used as well as molecular evaluation by PCR-RFLP and PCR-ASO mutants.

**Results:** By association of the classic and molecular laboratorial analysis methodologies, it has been observed that the proband was a carrier of the interaction between Hb D-Los Angeles and beta-thalassemia by CD39 and CD6-A. The analysis of the parents has evidenced that the mother was an Hb D-Los Angeles carrier and the father a heterozygote beta-thalassemia. A carrier of the globin chain variant and another with heterozygote beta-thalassemia have been observed in their progeny.

**Conclusions:** The Hb D-Los Angeles co-heritage with beta-thalassemia may be mistakenly diagnosed as hemoglobin D homozygosis or as Hb S homozygosis in situations where only electrophoresis in alkaline pH is performed. This

association is rare, with few cases reported in the literature and able to be characterized by screening of the molecular abnormalities.

Keywords: Hb D-Los Angeles, Beta-Thalassemia, Hemoglobinopathies.

**Abbreviations:**

HPLC - high performance liquid chromatography

PCR - polymerase chain reaction

RFLP – restriction fragment length polymorphism

ASO - allele-specific oligonucleotide hybridization

RT - retention time

LHGDH – Laboratory of Hemoglobins and Genetics of the Hematological Diseases

## **Introduction**

Variant hemoglobins are qualitative disorders, generally resulting from mutation (1). They are generated by substitutions that may alter the total protein charge, being easily identified by its abnormal electrophoretic mobility. However, they may be clinically and hematologically silent since such alteration does not affect the function or stability of the molecule (2,3). Hb D-Los Angeles, also known as D-Punjab was first described by Itano in 1951 in a family descendent from English and Indian living in Los Angeles (4). This variant belongs to the D hemoglobins (Hb D) group, whose main characteristic is presenting electrophoretic mobility similar to Hb S in alkaline pH and in the Hb A position at agar gel electrophoresis with acid pH. It is originated from the GAA $\rightarrow$ CAA transversion at codon 121 of the beta-globin gene, resulting from the replacement of glutamic acid for glutamine during the translation process (4). Even though this variant has a worldwide distribution, its greatest reservoir is in the Indian subcontinent. It is estimated that 3% of the Punjab population, in India, is a heterozygote carrier of this variant (5,6). The heterozygote individuals do not present any specific symptoms, resembling normal individuals. In Latin America, this hemoglobin has been described in Brazil, Argentina, Cuba, Guadeloupe, Jamaica, Venezuela and Mexico (4). In Brazil, Hb D-Los Angeles, is the third most common variant globin chain, after Hb S and Hb C (7).

Thalasseмии are quantitative disorders in the globin genes and are named according to the affected globin chain (1). They are characterized by the absence or decrease in the normal hemoglobin production, resulting in a

microcytic anemia of varied degrees. The beta thalassemia results an excess of free alpha globins which accumulate in the erythroblasts. The precipitation of these globin chains interferes with the erythropoiesis, cell maturation and with the normal functions of the cell membrane, leading to ineffective erythropoiesis and anemia (8).

Since the variants and the thalassemys may affect any globin chains forming the functional tetramer, it is possible to find associations between them. Hb D-Los Angeles is described as both in heterozygosis and as in homozygosis state, in addition to the combination with Hb S or with the alpha and beta thalassemys. The heterozygote individuals are asymptomatic (4); in homozygosis, they may present a decrease of the osmotic fragility, target cells and discreet hemolytic anemia (1). However, that ones presenting an association with Hb S or beta thalassemia may develop discreet to moderate hemolytic anemia (4).

This study describes a family with Hb D-Los Angeles and beta thalassemia, whose diagnosis was possible by associating classic and molecular procedures.

## Material and Methods

The casuistic comprised peripheral blood samples of the proband, a 40-year-old woman, her parents and two daughters analyzed for confirmation of the hemoglobins alterations diagnosis. The peripheral blood was collected in a sterile tube with 5% EDTA anticoagulant, after informed consent. Screening tests were carried out, consisting of osmotic globular resistance in NaCl solution at 0.36% (9), analysis of the red blood cell morphology (10) and cellulose acetate electrophoresis using the Tris-EDTA-Borate buffer in 8.5 pH (11). As a confirmation procedure, electrophoresis in agar with phosphate buffer with 6.2 pH (12); globin chains electrophoresis in cellulose acetate with the Tris-EDTA-Borate, urea and mercaptoethanol buffer (13) and high performance liquid chromatography (HPLC), on the BIO-RAD Variant automated analyzer with the beta thalassemia short program.

For the molecular analysis, the DNA was obtained from the white blood cells through the phenolic extraction method (14). For the diagnosis of Hb D-Los Angeles, the exon 3 of beta globin was amplified by the polymerase chain reaction (PCR) (15). The primers sequence used in the amplification reaction was: Primer sense - CD1 5' TGC CTC TTT GCA TTC TA 3' e Primer anti-sense - CD2 5'TAG AAT GGT GCA AAG AGG CA 3'. Five microliters of the amplified product were digested with *EcoRI* restriction endonuclease according to the manufacturer's instructions and the digestion product submitted to polyacrylamide gel electrophoresis for the mutant and/or normal bands. Codon 121 presents a digestion site for the *EcoRI* enzyme in the normal allele, which is

excluded in the D-Los Angeles mutant, allowing the PCR and restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis. The digestion of the normal allele generates products of 296pb and 268pb, while the mutant allele presents only a 564pb band.

For the diagnosis of the beta thalassemia, polymerase chain reaction and allele-specific oligonucleotide hybridization (PCR-ASO) molecular tests were performed, with *mDx*<sup>TM</sup> kits (BIO-RAD) for detection of 16 different mutations, from them of the Mediterranean origin - CD39, IVS1:110, IVS1:6, IVS1:1, IVS2:745, IVS2:1, -87, CD6-A and Asian origin - CD41-42, CD17, -28, IVS2;654, CD19, IVS1:5, CD71-72, HbE.

## Results

The proband, initially diagnosed as Hb S homozygous was sent to the LHGDH – IBILCE – UNESP for abnormal hemoglobin research and familiar studies since she did not present a hematological and clinical profile of sickle-cell anemia. In the screening tests, only the proband presented positive globular osmotic resistance at the 0.36% NaCl solution, whereas her relatives tested were negative. Mild alterations in the red blood cell morphology, such as microcytosis and hypochromia, were found in all family members. In the alkaline pH electrophoresis, the proband presented a unique fraction at the Hb S position, whereas her mother and one of her daughters (daughter 1) presented two fractions, one at the Hb A position and another similar to the Hb S. Her father and the other daughter (daughter 2) showed a fraction at the Hb A position with probable increased Hb A<sub>2</sub>. Fractions with electrophoretic mobility similar to the Hb A in those individuals presenting the alkaline pH variant were observed through acid electrophoresis. Such electrophoretic behavior is associated to hemoglobin D type, especially Hb D-Los Angeles. It was possible to confirm that the variant was a beta globin chain mutant by globin chain electrophoresis. In HPLC, the proband presented a hemoglobin fraction at the “Hb D window” with 88.8% and, retention time (RT) of 4.30; 3.5% of the Hb A<sub>2</sub> and 1.5% of the Hb F. Both, mother and daughter 1, with the hemoglobin variant, presented a heterozygote chromatographic profile; however, the abnormal hemoglobin was eluted at the “Hb S window”. The father and the daughter 2 presented Hb A<sub>2</sub> fraction with

increased values. Figure 1 show the chromatograms of each family member obtained by HPLC.

After amplification by PCR and enzymatic digestion with *EcoRI* restriction endonuclease, DNA samples of the proband, her mother and daughter 1 with the variant hemoglobin, were analyzed and fragments corresponding to the mutant allele for Hb D-Los Angeles and the normal allele were found.

For confirmation of the beta thalassemias status, the PCR-ASO methodology was used for the most common Mediterranean and Asian mutations. The proband, her father and daughter 2 tested positive for the CD39 and CD6-A mutations. Figure 2 show the family pedigree.

The diagnosed individuals' results were presented by the responsible physician and geneticist.

## Discussion

Hemoglobin electrophoresis in alkaline pH at cellulose acetate is the most used method for identification of abnormal hemoglobins; however, its sensibility is limited, mainly in cases of isoforms co-migration, such as the Hb S and Hb D. At the acid agar gel electrophoresis, it has been possible to differentiate the Hb S from hemoglobin D type, since such hemoglobins migrate similarly to the Hb A in this pH. The Hb S and D are mutants of the beta globin chain and shown similar migration at alkaline pH globin chains electrophoresis.

The proband presented only one band in the Hb S position at alkaline pH electrophoresis, one band at the Hb A position in acid pH and one band at the beta<sup>D</sup> position in globin chains electrophoresis. Such situation may be confused with Hb D homozygosis. Both mother and daughter 1 with variant hemoglobin have presented a heterozygote pattern for hemoglobin D type, while the father and daughter 2, presented a Hb A homozygote pattern with probable increased Hb A<sub>2</sub>.

HPLC, supplies quantitative data of the variant hemoglobins, even when they are present in small amounts. The windows with retention times of each sample allow the identification of some hemoglobin variants, becoming an important method for the differential diagnosis of hemoglobinopathies. The family samples evaluated by HPLC shown in the proband an increased Hb D value – 88.8%, normal Hb A<sub>2</sub> value and slightly increased Hb F. Data in the

literature indicate that Hb D homozygote individuals present values higher than 95% for the variant when analyzed by the HPLC (1).

An important fact refers to the windows in which the samples were eluted. The variant found in the proband was eluted at the “Hb D window” whereas, in the sample of the mother and daughter 1, the variants were eluted at the “Hb S window”, though with retention time close to the one found at the Hb D window. Thus, the results obtained in the several procedures used have been analyzed as a whole, since each methodology presented advantages and limitations, evidencing the need to associate classic and molecular methodologies for the appropriate diagnosis of hemoglobinopathies. The family analysis data indicated that the proband could not be homozygote, since only one of the parents was a carrier of the variant in question.

The molecular analysis for identification of the mutant generating the phenotypes of the hemoglobins observed was carried out by the amplification of beta globin gene exon 3 and enzymatic digestion by the *EcoRI* restriction enzyme, aiming the analysis of the RFLP in polyacrylamide gel for the samples suspected of Hb D-Los Angeles. Therefore, in the heterozygotes may be observed 3 fragments: 296pb and 268 pb of the normal allele and 564 pb of the mutant allele, not digested by the enzyme. All three presented a heterozygote RFLP pattern for Hb D-Los Angeles. These findings confirm the presence of Hb D-Los Angeles in the samples analyzed and definitely excluded the Hb D homozygosis for the proband.

The PCR-ASO methodology has become a useful tool for genetic analysis. In such procedure, genomic DNA is amplified with specific primers and the detection of mutations is based in the principle of allele-specific oligonucleotide hybridization, forming a stable duplex with the target DNA sequence, only if all the base pairs in the duplex match perfectly. This methodology was used to confirm and identify the mutants originating beta thalassemia in the proband, in the father and the daughter 2. CD-39 (CAG  $\Pi$  TAG) and CD6-A (GAG  $\Pi$  G-G) mutations have been confirmed in the three members of the family analyzed, both of Mediterranean origin.

Hb D-Los Angeles has been described both in heterozygosis and homozygosis, as well as in combination with Hb S, alpha or beta thalassemia (1,4,16). The heterozygote are asymptomatic (1,4,17); in homozygosis individuals may present a decrease in osmotic fragility, target cells, normal Hb A<sub>2</sub> levels and mild hemolytic anemia, though a very rare situation (1). The Hb D and beta thalassemia co-heritage is very slightly described in the world literature and their carriers may present microcytosis, erythrocytosis, and mild-to-moderate hemolytic anemia (1,4).

## **Conclusions**

Routine methodologies used to identify hemoglobin variants present limitations and advantages, making it impossible to reach a definite diagnosis by only one of them. The use of classic techniques associated with molecular studies for the accurate identification of these abnormal hemoglobins is essential, mainly in countries with high frequency of different hemoglobin defects. Depending on the region of the country analyzed, different frequencies for certain hemoglobin disorders are found, since some of them are related to the European, African or Asian origin of the founding population. Brazil presents a high racial admixture rate and the association of different hemoglobins is constant.

The co-heritage of Hb D-Los Angeles with beta thalassemia may be mistakenly diagnosed as Hb D homozygosis. This association is very rare, with few cases reported in literature and possible to be characterized only by tracking molecular defects. The accurate identification of mutants assists genetic counseling and the therapeutic approach.

## Acknowledgment

We are grateful to BIO-RAD, BIO-OXFORD by the support and technical assistance. We thank Dr. Gustavo O.B. Rodriguez, Hamilton Cabral, Fábio R. Lombardi for help during this study. We thank Érika Stupiello for translation.

## References

1. Ahmed M, Stuhmann M, Bashawri L, Kuhnau W, El-Harith E-HA. The  $\beta$ -globin genotype E121Q/W15X (cd121GAA[CAA/cd15TGG[TTGA) underlines HbD/ $\beta$ -(0) thalassaemia marked by domination of haemoglobin D. Ann Hematol 2001; 80: 629-33.
2. Grignoli CRE, et al. Hb Rio Claro[ $\beta$ 34 (B16) Val[Met]: a novel electrophoretically silent variant found in association with Hb Hasahron [ $\alpha$ 47 (CE5) Asp[His] and  $\alpha$ -thalassaemia-2 ( $-\alpha^{3.7}$ ). Hemoglobin 1999; 23: 177-82.
3. Wenning MRSC, et al. Hb Campinas[ $\alpha$ 26 (B7) Ala[Val]: a novel, electrophoretically silent, variant. Hemoglobin 2000; 24: 143-8.

4. Perea FJ, et al. Hb D-Los Angeles associated with Hb S or  $\beta$ -thalassemia in four Mexican mestizo families. *Hemoglobin* 1999; 23: 231-7.
5. Zeng Y, Huang S, Ren Z, Li H, et al. Identification of Hb D-Punjab gene: application of DNA amplification in the study of abnormal hemoglobins. *Am J Hum Genet* 1989; 44: 886-9.
6. Fioretti G, et al. DNA polymorphisms associated with Hb D-Los Angeles [ $\beta$  121 (GH4)GLU  $\rightarrow$  GLN] in Southern Italy. *Hemoglobin* 1993; 17: 9-17.
7. Leoneli GG. Hemoglobina D – Caracterização eletroforética e molecular. Dissertação (Mestrado em genética). São José do Rio Preto, São Paulo: Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas – UNESP, 2001: 107pp.
8. THALASSEMIA.com. <http://www.thalassemia.com/medical/definition.shtml>  
(Accessed: april 2002).
9. Silvestroni E; Bianco I. Screening for microcytemia in Italy: analysis of data collected in the past 30 years. *Am J Hum Genet* 1975; 27; 198-212.
10. Bonini-Domingos CR. Prevenção das hemoglobinopatias no Brasil - Diversidade Genética e Metodologia Laboratorial.Tese (Doutorado em Ciências) -

São José do Rio Preto, São Paulo: Instituto de Biociências, Letras e Ciência Exatas, Universidade Estadual Paulista – UNESP, 1993: 144pp.

11. Marengo-Rowe AJ. Rapid electrophoresis and quantitation of haemoglobin on cellulose acetate. *J Clin Path* 1965; 18: 790-2.

12. Vella F. Acid agar gel electrophoresis of human hemoglobin. *Am J Clin Path*, 1968; 49: 440-2.

13. Schneider RG. Differentiation of electrophoretically hemoglobins - such as S, D ou G and P or A<sub>2</sub>, C, E and O – by electrophoresis of the globin chains. *Clin Chem* 1974; 20: 1111-5.

14. Pena SDJ et al. DNA bioprints: simple non-isotopic DNA fingerprints with biotinylated probes. *Electrophoresis* 1991; 12: 146-52.

15. Saiki RK et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 1988; 230: 487-91.

16. Ozsoylu S. Homozigous hemoglobin D Punjab. *Acta Haemat* 1970; 43: 353-9.

17. Fodor FH; Eng CM. Molecular exclusion of haemoglobin SD disease by prenatal diagnosis. *Prenat. Diagn.* 1999; 19: 58-60.

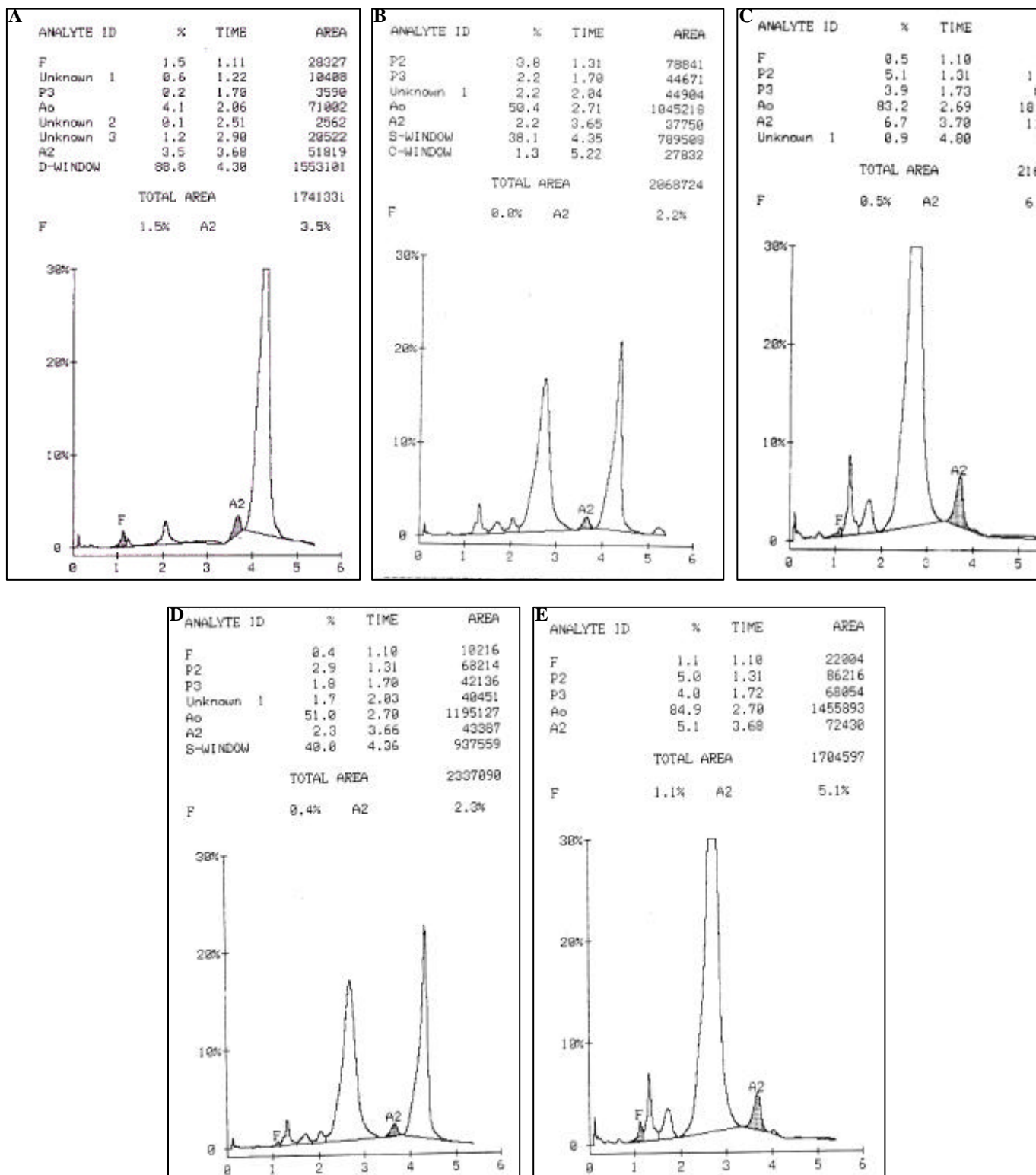


Figure 1: HPLC chromatograms of the family analyzed. A: proband – with Hb D-Los Angeles and thalassemia, B: mother – carrier of Hb D-Los Angeles, C: father – carrier of beta thalassemia, D: proband daughter 1: carrier of Hb D-Los Angeles and E: proband daughter 2 – carrier of beta thalassemia.

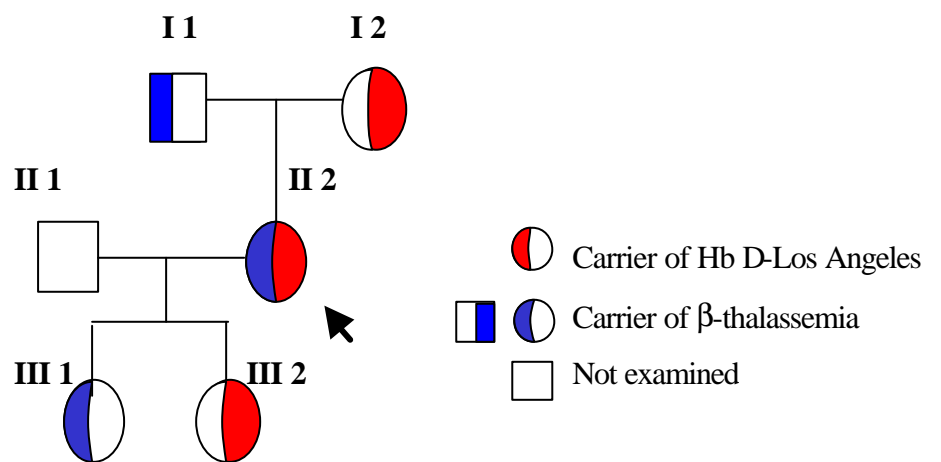


Figure 2: Pedigree of the family affected with Hb D-Los Angeles and  $\beta$ -thalassemia. The arrow indicates the propositus.

Este artigo será submetido à Brazilian Journal of Medical and Biological Research

ISSN: 0100-879X

# **Identificação de interação entre mutantes de Hemoglobina D-Los Angeles e Hemoglobina S por avaliação molecular.**

A.R. Chinelato-Fernandes<sup>1</sup>, C.R. Bonini-Domingos<sup>2</sup>

*1. Laboratório de Hemoglobinas e Genética das Doenças Hematológicas (LHGDH). Mestre em Genética pelo programa de Pós-Graduação do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, UNESP – São José do Rio Preto - SP.*

*2. Professora Doutora responsável pelo Laboratório de Hemoglobinas e Genética das Doenças Hematológicas (LHGDH), do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, UNESP – São José do Rio Preto - SP.*

Endereço para correspondência:

Ana Regina Chinelato Fernandes

IBILCE - UNESP

R. Cristóvão Colombo, 2265

CEP:15054-000

São José do Rio Preto - SP

Fone: (17) 221 2392

Fax: (17) 224 6355

e-mail: [ar.chinelato@uol.com.br](mailto:ar.chinelato@uol.com.br)

## **Resumo**

A mais comum das hemoglobinas D, Hb D-Los Angeles, também conhecida como Hb D Punjab é originada por uma mutação GAA  $\rightarrow$  CAA no códon 121 da globina beta, que resulta na substituição de ácido glutâmico por glutamina no polipeptídeo. Embora os heterozigotos sejam assintomáticos, a herança com Hb S pode levar à uma doença severa, semelhante à anemia falciforme, chamada de doença de Hb SD. Para a confirmação dessa associação de hemoglobinas anormais, foram utilizadas metodologias clássicas e moleculares de diagnóstico. A criança analisada é portadora da doença de Hb SD; entretanto, apresentou crises discretas até o momento devido ao diagnóstico precoce. O diagnóstico precoce e o tratamento adequado são importantes para a melhoria na qualidade de vida dos indivíduos portadores dessa hemoglobinopatia.

Palavras chaves: Hemoglobinopatias, Doença de Hb SD, Variantes de hemoglobinas.

## **Abstract**

The most common Hb D, Hb D-Los Angeles, also known as D-Punjab, is originated from the GAA $\Pi$ CAA transversion at codon 121 of the beta-globin gene, resulting from the replacement of glutamic acid for glutamine in the polypeptide. Although heterozygotes are asymptomatic, the co-inheritance with Hb S may result a severe disorder, similar to sickle-cell anemia, known as Hb SD disease. For confirmation this double heterozygosis classical and molecular diagnosis methodologies have been used. The child evaluated is an Hb SD disease carrier; however, presented mild crises so far due to early detection. Early diagnosis and proper management are important for lifestyle improvement of hemoglobinopathies carriers.

Keywords: Hemoglobinopathies, Hb SD disease, Hemoglobin variants.

## Introdução

A Hb D-Los Angeles, também conhecida como D-Punjab, pertence ao grupo das hemoglobinas tipo D (Hb D), cuja característica principal é apresentar mobilidade eletroforética similar à Hb S em pH alcalino e na posição da Hb A em gel de ágar, pH ácido. Essa variante é originada da transversão GAAΠCAA no códon 121 do gene da beta globina. A mutação resulta na troca do ácido glutâmico por glutamina durante o processo de tradução<sup>(1,2)</sup>. Em Punjab, na Índia, sua frequência é estimada em 3%. Na América Latina foi descrita em vários países, inclusive no Brasil<sup>(1)</sup>, constituindo a terceira variante mais comum, depois das hemoglobinas S e C<sup>(3)</sup>.

Essa hemoglobina foi descrita tanto em heterozigose como em homozigose, além da combinação com outras variantes e talassemias. Os duplos heterozigotos para Hb D-Los Angeles e Hb S, conhecida como doença de Hb SD, podem desenvolver quadros clínicos severos, semelhantes aos homozigotos para Hb S<sup>(2,4,5)</sup>. O fenótipo severo parece ser devido à um aumento na polimerização da Hb S que seria facilitado pela mutação para Hb D-Los Angeles<sup>(6)</sup>.

No presente trabalho foram descritos os achados laboratoriais de um indivíduo de ascendência caucasiana, portador da associação entre Hb D-Los Angeles e Hb S.

## Material e Métodos

Uma criança, com 8 anos, portadora da associação de Hb D-Los Angeles e Hb S foi analisada para confirmação do diagnóstico de alterações de hemoglobinas. O sangue foi coletado em frasco estéril com anticoagulante EDTA 5%, após consentimento informado. Para a determinação dessa associação, foram realizados testes de triagem de hemoglobinopatias, que consistiram de resistência globular osmótica em solução de NaCl a 0,36%<sup>(7)</sup>, análise da morfologia eritrocitária à fresco<sup>(8)</sup> e eletroforese alcalina em acetato de celulose utilizando-se tampão Tris-EDTA-Borato em pH 8,5<sup>(9)</sup>. Como procedimento de confirmação, foram realizadas as eletroforeses em ágar com tampão fosfato pH 6,2<sup>(10)</sup>; de cadeias globínicas em acetato de celulose com tampão Tris-EDTA-Borato, uréia e mercaptoetanol<sup>(11)</sup>, focalização isoeletrica<sup>(12)</sup> e cromatografia líquida de alta pressão (HPLC), com o equipamento VARIANT (BIO RAD Laboratories), utilizando-se o kit de diagnóstico para talassemia beta heterozigota.

Para as análises moleculares, o DNA foi obtido dos glóbulos brancos através do método de extração fenólica<sup>(13)</sup>. Para o diagnóstico de Hb D-Los Angeles, o éxon 3 da globina beta foi amplificado através da reação em cadeia da polimerase (PCR)<sup>(14)</sup>. A sequência de *primers* utilizada na reação de amplificação foi: *Primer* sense - CD1 5' TGC CTC TTT GCA TTC TA 3' e *Primer* anti-sense - CD2 5'TAG AAT GGT GCA AAG AGG CA 3'. Do produto amplificado, cinco microlitros foram digeridos com a endonuclease de restrição *EcoRI* de acordo com as instruções do fabricante e o produto da digestão submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida para observação das bandas mutantes e/ou normais. O códon 121 apresenta um sítio de digestão para a enzima *EcoRI* no alelo normal, que é excluído no mutante D-Los Angeles, permitindo a análise por PCR e polimorfismos de comprimento (RFLP). A digestão do alelo normal gera produtos de 296pb e 268pb enquanto que o alelo mutante apresenta uma única banda de 564pb.

Para o diagnóstico hemoglobina S, foi realizado o teste molecular por PCR e oligonucleotídeos alelo específicos (ASO), com kits *mDx* (BIO-RAD Laboratories) para detecção dos alelos S e C.

## Resultados e Discussão

Uma criança, caucasiana com 11,0 g/dL de hemoglobina,  $4,2 \cdot 10^6$   $\mu$ L de glóbulos vermelhos e 37 % de hematócrito, cujos valores encontravam-se dentro dos limites de normalidade, apresentou crises de falcização discretas e foi avaliada quanto à presença de Hb anormais por procedimentos eletroforéticos, apresentando perfil para Hb S homozigota em pH alcalino .

A amostra de sangue da criança foi encaminhada ao LHGDH – IBILCE – UNESP para pesquisa de hemoglobinas anormais. Nos testes de triagem, apresentou resistência globular osmótica positiva em solução de NaCl 0,36% e alterações moderadas na morfologia eritrocitária, com presença de microcitose, hipocromia e células falcizadas. Na eletroforese em acetato de celulose, pH alcalino, apresentou uma única fração na posição de Hb S e uma pequena fração de Hb F. Essa eletroforese é o método mais utilizado para a identificação preliminar de variantes de hemoglobinas; entretanto, sua sensibilidade é limitada, especialmente nos casos de co-migração de isoformas, como as hemoglobinas S e D. Através da eletroforese em gel de ágar, pH ácido, diferenciou-se as Hb S das hemoglobinas do tipo D, uma vez que essas migram de forma semelhante à Hb A neste pH. Assim, foi possível a visualização de duas frações na amostra, uma na posição de Hb S e outra na posição de Hb A. Pela eletroforese de cadeias globínicas, em pH alcalino, observou-se que as Hb S e D, apresentaram migração semelhante. Na focalização isoeletrica, não foi possível a diferenciação com o equipamento utilizado, uma vez que as Hb S e D apresentam diferenças muito pequenas com relação ao padrão de migração nesse procedimento. Na HPLC, a amostra apresentou uma fração de hemoglobina na janela de Hb D, com porcentagem de 37,7 e tempo de retenção (RT) de 4,30; uma fração na janela de Hb S com 48,2% e RT de 4,58, Hb A<sub>2</sub> de 3,8% e Hb F de 5,4%, como pode ser observado na figura 1. A cromatografia, com o uso da HPLC, no sistema VARIANT (BIO-RAD Laboratories), fornece dados quantitativos das hemoglobinas variantes, mesmo que estas estejam presentes em pequenas quantidades. As janelas com os tempos de retenção de cada amostra

permitem a identificação de algumas variantes de hemoglobinas, tornando-se um método importante para o diagnóstico diferencial das hemoglobinopatias.

A análise molecular para identificação dos mutantes que geravam o fenótipo de hemoglobinas observado nos procedimentos de diagnóstico clássico, foi realizada através da amplificação do éxon 3 do gene da globina beta e digestão enzimática pela enzima de restrição *EcoRI*, objetivando a análise dos RFLP em gel de poliacrilamida. Desse modo, pode-se observar 3 fragmentos: um de 564pb correspondente ao alelo mutante, que não foi digerido pela enzima, e dois sendo um fragmento de 296pb e outro de 268pb correspondentes ao alelo S, cujo padrão assemelha-se ao alelo normal, pois a mutação que origina a Hb S encontra-se em outro éxon.

A metodologia PCR-ASO tornou-se uma ferramenta útil para a análise genética. Para tal procedimento, o DNA genômico deve ser amplificado com *primers* específicos e a detecção de mutações é baseada na hibridação com um oligonucleotídeo alelo específico sintético que formará um dúplice estável com a sequência de DNA alvo, somente se todos os pares de base no dúplice forem perfeitamente pareados. Essa metodologia foi utilizada para confirmação e identificação do alelo S.

Os indivíduos com a associação de Hb D-Los Angeles e Hb S, conhecida como doença de Hb SD, podem desenvolver distúrbios severos, como anemia hemolítica crônica, dores, infecções recorrentes, hepatoesplenomegalia, dependentes ou não de transfusão sanguínea. Muitas vezes são clinicamente e hematologicamente semelhantes aos homocigotos para Hb S<sup>(2,4,5)</sup>. O fenótipo severo parece ser devido à um aumento na polimerização da Hb S que seria facilitado pela mutação para Hb D-Los Angeles no códon 121<sup>(6)</sup>. O diagnóstico precoce pode auxiliar no desenvolvimento da conduta adequada para tais casos, minimizando os efeitos das crises decorrentes da falcização da Hb S. Além disso, as medidas profiláticas, como o aconselhamento genético para os pais portadores dessas variantes e o diagnóstico pré-natal, devem ser adotadas<sup>(15)</sup>.

A criança avaliada apresenta índices hematimétricos dentro da faixa de normalidade e com crises brandas de dor e de hemólise, devido

principalmente às boas condições sócio-econômicas da família e de conduta terapêutica adotada após o diagnóstico precoce.

## **Agradecimentos**

Nós agradecemos à BIO-RAD, BIO-OXFORD pela assistência técnico-científica. Ao Dr. Gustavo O. B. Rodriguez, Hamilton Cabral e Fábio R. Lombardi pelo auxílio durante este trabalho. À profa. Érika Stupiello pela revisão no Abstract.

## **Referências bibliográficas**

1. Perea, F.J. et al. Hb D-Los Angeles associated with Hb S or  $\beta$ -thalassemia in four Mexican mestizo families. **Hemoglobin**, 23: 231-237, 1999.
2. Fodor, F.H.; Eng, C.M. Molecular exclusion of haemoglobin SD disease by prenatal diagnosis. **Prenat. Diagn.**, 19: 58-60, 1999.
3. Leoneli, G.G. **Hemoglobina D – Caracterização eletroforética e molecular**. 2001.107f. Dissertação (Mestrado em Genética). Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas – UNESP, São José do Rio Preto-SP.
4. Zago, M.A., Costa, F.F. Hb D-Los Angeles in Brazil: simple heterozygotes and associations with  $\beta$ -thalassemia and with Hb S. **Hemoglobin**, 12: 399-403, 1988.
5. Athanasiou-Metaxa, M. et al. Co-inheritance of Hemoglobin D-Punjab and Hemoglobin S: Case Report. **J. Ped. Hematol. Oncol.**, 24: 421-422, 2002.
6. Adachi, K et al. Facilitation of Hb S polymerization by the substitution of GLU for GLN at beta 121. **J. Biol. Chem.**, 263: 5607-5610, 1988.
7. Silvestroni, E.; Bianco, I. Screening for microcytemia in Italy: analysis of data collected in the past 30 years. **Am. J. Hum. Genet.**, 27: 198-212, 1975.
8. Bonini-Domingos, C.R. **Prevenção das hemoglobinopatias no Brasil - Diversidade Genética e Metodologia Laboratorial**. 1993. 144f. Tese

(Doutorado em Ciências) - Instituto de Biociências, Letras e Ciência Exatas, Universidade Estadual Paulista – UNESP, São José do Rio Preto-SP.

9. Marengo-Rowe, A.J. Rapid electrophoresis and quantitation of haemoglobin on cellulose acetate. **J. Clin. Path.**, 18: 790-792, 1965.

10. Vella, F. Acid agar gel electrophoresis of human hemoglobin. **Am. J. Clin. Path.**, 49(3): 440-442, 1968.

11. Schneider, R.G. Differentiation of electrophoretically hemoglobins - such as S, D ou G and P or A<sub>2</sub>, C, E and O – by electrophoresis of the globin chains. **Clin. Chem.**, 20: 1111-1115, 1974.

12: Naoum, P.C. **Eletroforese - Técnicas e Diagnósticos**. 2<sup>a</sup> edição. Santos Livraria Editora, 1999. 154 p.

13. Pena, S.D.J. et al. DNA bioprints: simple non-isotopic DNA fingerprints with biotinnylated probes. **Electrophoresis**, 12: 146-152, 1991.

14. Saiki, R.K et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science**, 230: 487-491, 1988.

15. El-Kalla, S.; Mathews, A.R. Hb D-Punjab in the United Arab Emirates. **Hemoglobin**, 21: 369-375, 1997.

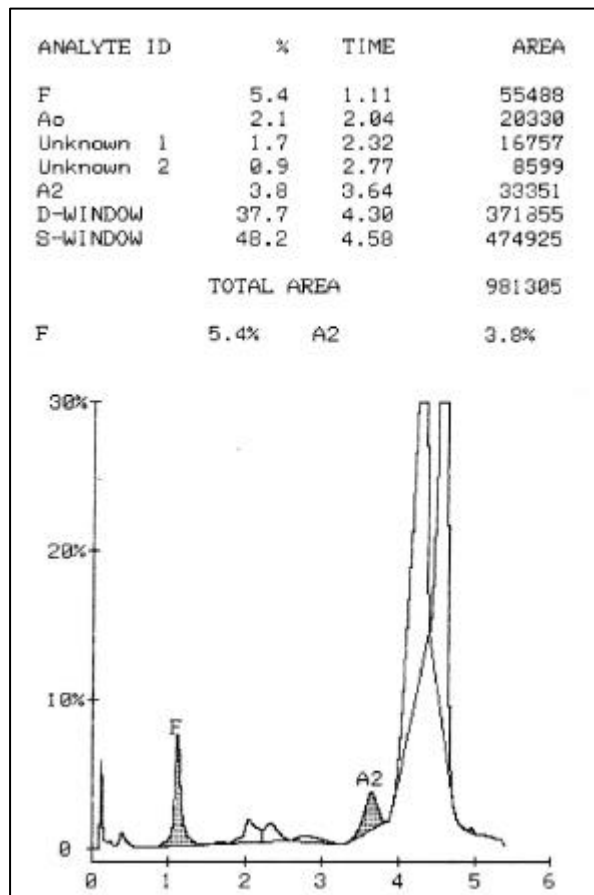


Figura 1: Cromatograma obtidos por HPLC em amostra de sangue com Doença de Hemoglobina SD-Los Angeles.

Este artigo será submetido à Hemoglobin  
ISSN: 1532-432X

**Caracterização molecular da interação de Hemoglobinas  
Lepore e D-Los Angeles em núcleo familiar da população  
brasileira.**

Chinelato-Fernandes, A.R.<sup>1</sup>, Bonini-Domingos, C.R.<sup>2</sup>

*2. Laboratório de Hemoglobinas e Genética das Doenças Hematológicas (LHGDH). Mestre em Genética pelo programa de Pós-Graduação do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, UNESP – São José do Rio Preto - SP.*

*2. Professora Doutora responsável pelo Laboratório de Hemoglobinas e Genética das Doenças Hematológicas (LHGDH), do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, UNESP – São José do Rio Preto - SP.*

Endereço para correspondência:

Ana Regina Chinelato Fernandes

IBILCE - UNESP

R. Cristóvão Colombo, 2265

CEP:15054-000

São José do Rio Preto - SP

Fone: (17) 221 2392

Fax: (17) 224 6355

e-mail: [ar.chinelato@uol.com.br](mailto:ar.chinelato@uol.com.br)

## Resumo

A hemoglobina Lepore é originada pela fusão dos genes delta e beta após a ocorrência de um *crossing-over* desigual, resultando em cadeias globínicas que contêm uma sequência de aminoácidos idêntica à região amino terminal da cadeia delta e à carboxi terminal da cadeia beta. Três tipos distintos de Hb Lepore podem ser identificados, dependendo do ponto de quebra.

A mais comum das hemoglobinas D, Hb D-Los Angeles, também conhecida como Hb D Punjab é originada por uma mutação GAA  $\rightarrow$  CAA no códon 121 da globina beta, que resulta na substituição de ácido glutâmico por glutamina no polipeptídeo. Embora os heterozigotos sejam assintomáticos, a herança dos mutantes com outras variantes de hemoglobina pode resultar em grande diversidade clínica. Para a confirmação de associações de hemoglobinas anormais, é necessário a utilização de metodologias clássicas e moleculares. Descrevemos aqui o caso de um paciente, portador de Hb Lepore e de sua mãe, que apresenta uma associação entre Hb Lepore e D-Los Angeles.

Palavras chaves: Hemoglobinopatias, Hb Lepore/D-Los Angeles, Variantes de Hemoglobina.

## **Abstract**

Hemoglobin Lepore is originated from fusion of  $\delta$  and  $\beta$  genes after an unequal crossing over, resulting in globin chains containing an amino acid sequence identical to the amino-terminal of the human  $\delta$  globin chain and carboxy-terminal amino acid sequence which is identical to the one found in the  $\beta$  globin chain. Three distinct types of Lepore hemoglobins may be identified depending on their crossover points.

The most common Hb D, Hb D-Los Angeles, also known as D-Punjab, is originated from the GAA $\Pi$ CAA transversion at codon 121 of the beta-globin gene, resulting from the replacement of glutamic acid for glutamine in the polypeptide. Although heterozygotes are asymptomatic, the inheritance of mutants with other variants may result a large clinical diversity. For confirmation of the association of abnormal hemoglobins it is necessary to use classical and molecular methodologies. In this work we describe a case of carrier of Hb Lepore and his mother, double heterozygous with Hb Lepore and Hb D-Los Angeles.

Keywords: Hemoglobinopathies, Hb Lepore/D-Los Angeles, Hemoglobin variants

## Introdução

A hemoglobina Lepore foi descrita pela primeira vez em 1958 por Gerald e Diamond, em indivíduos de origem italiana<sup>(1)</sup>. Posteriormente, descobriu-se que essa variante é originada pela fusão dos genes delta e beta após a ocorrência de um *crossing-over* desigual, durante o pareamento dos cromossomos homólogos na meiose. O gene híbrido leva à formação reduzida de cadeias globínicas devido à natureza instável do seu mRNA, resultando em um fenótipo similar à talassemia beta. As poucas globinas sintetizadas contêm uma sequência de aminoácidos idêntica à região amino terminal da cadeia delta e à carboxi terminal da cadeia beta<sup>(2,3)</sup>. Na eletroforese em pH alcalino, essa variante migra de forma semelhante à da Hb S e da Hb D<sup>(4)</sup>. Os heterozigotos apresentam sintomas similares à talassemia beta e os homozigotos, anemia severa<sup>(5,6)</sup>. Três tipos distintos de Hb Lepore podem ser identificados, dependendo do ponto de quebra – Hb Lepore Washington-Boston, Hb Lepore Baltimore e Hb Lepore Holanda<sup>(3,5)</sup>.

A Hb D-Los Angeles, também conhecida como D-Punjab, foi descrita pela primeira vez por Itano em 1951<sup>(7,8)</sup>. Pertence ao grupo de hemoglobinas tipo D (Hb D), cuja característica principal é apresentar mobilidade eletroforética similar à Hb S em pH alcalino e na posição da Hb A em gel de ágar em pH ácido. Essa variante é originada da transversão GAAΠCAA no códon 121 do gene da beta globina. A mutação resulta na troca do ácido glutâmico por glutamina durante o processo de tradução<sup>(9,10)</sup>. Na região de Punjab, na Índia, sua frequência é estimada em 3%. Na América Latina foi descrita em vários países, inclusive no Brasil<sup>(9)</sup>, constituindo a terceira variante mais comum, depois das hemoglobinas S e C<sup>(11)</sup>.

Essa hemoglobina foi descrita tanto em heterozigose como em homozigose, além da combinação com outras variantes e talassemias.

No presente trabalho foi descrito o diagnóstico laboratorial de um paciente, portador de Hb Lepore e sua mãe, que apresenta a associação entre Hb Lepore e D-Los Angeles.

## Material e Métodos

O propósito foi um menino com 11 anos, com anemia discreta não responsiva ao tratamento convencional, portador de Hb Lepore e sua mãe, com 38 anos, com anemia discreta e associação entre Hb Lepore e D-Los Angeles. O sangue desses indivíduos foi coletado em frasco estéril com anticoagulante EDTA 5%, após consentimento informado. Para a determinação dessa associação, foram realizados testes de triagem de hemoglobinopatias, que consistiram de resistência globular osmótica em solução de NaCl a 0,36%<sup>(12)</sup>, análise da morfologia eritrocitária à fresco<sup>(13)</sup> e eletroforese alcalina em acetato de celulose utilizando-se tampão Tris-EDTA-Borato em pH 8,5<sup>(14)</sup>. Como procedimento de confirmação, foram realizadas as eletroforeses em ágar com tampão fosfato pH 6,2<sup>(15)</sup>; de cadeias globínicas em acetato de celulose com tampão Tris-EDTA-Borato, uréia e mercaptoetanol<sup>(16)</sup> e cromatografia líquida de alta pressão (HPLC), com o equipamento VARIANT (BIO-RAD Laboratories), utilizando-se o kit de diagnóstico para talassemia beta heterozigota.

Para as análises moleculares, o DNA foi obtido dos glóbulos brancos através do método de extração fenólica<sup>(17)</sup>. A Hb Lepore foi identificada por HPLC. Para o diagnóstico de Hb D-Los Angeles, o éxon 3 da globina beta foi amplificado através da reação em cadeia da polimerase (PCR)<sup>(18)</sup>. A sequência de *primers* utilizada na reação de amplificação foi: *Primer* sense - CD1 5' TGC CTC TTT GCA TTC TA 3' e *Primer* anti-sense - CD2 5'TAG AAT GGT GCA AAG AGG CA 3'. Do produto amplificado, cinco microlitros foram digeridos com a endonuclease de restrição *EcoRI* de acordo com as instruções do fabricante e o produto da digestão submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida para observação das bandas mutantes e/ou normais. O códon 121 apresenta um sítio de digestão para a enzima *EcoRI* no alelo normal, que é excluído no mutante D-Los Angeles, permitindo a análise por PCR e polimorfismos de comprimento (RFLP). A digestão do alelo normal gera produtos de 296pb e 268pb enquanto que o alelo mutante apresenta uma única banda de 564pb.

## Resultados e Discussão

Os dados hematológicos obtidos por sistema automatizados foram: para o probando - 13,4 g/dL de hemoglobinas (Hb), 41,3 % de hematócrito (HCT), 64,9 fL de volume corpuscular médio (VCM) e 16,8% na distribuição de tamanhos dos eritrócitos (RDW) e para a mãe - 10,9 g/dL de Hb, 32,4 % de HCT, 59,9 fL de VCM e 16% de RDW.

As amostras de sangue do probando e sua mãe foram encaminhadas ao LHGDH – IBILCE – UNESP para pesquisa de hemoglobinas, devido à presença de anemia frequente na criança. Nos testes de triagem, tanto a mãe como o filho apresentaram resistência globular osmótica negativa em solução de NaCl 0,36% e alterações moderadas na morfologia eritrocitária. Na eletroforese em acetato de celulose, pH alcalino, o probando apresentou uma fração na posição de Hb A e outra na posição de Hb S e a mãe, uma única fração na posição de Hb S. Essa eletroforese é o método mais utilizado para a identificação de hemoglobinas; entretanto, sua sensibilidade é limitada, especialmente nos casos de co-migração de isoformas, como as hemoglobinas S, D e Lepore. Através da eletroforese em gel de ágar, pH ácido, pode-se diferenciar algumas variantes de hemoglobinas. Na amostra do probando, observou-se uma fração na posição de Hb A e outra na posição de Hb F e na amostra da mãe, foi observada uma única fração em posição intermediária entre Hb S e A. Na eletroforese de cadeias globínicas em pH alcalino, o probando apresentou padrão de migração normal, o que é esperado para Hb Lepore e a mãe um banda na posição de mutante de cadeia beta semelhante à migração da  $\beta^D$ . Na HPLC, o probando apresentou uma fração na janela de Hb A com 70,8% e tempo de retenção (RT) de 2,58 e uma fração de Hb A<sub>2</sub> aumentada, com 13,6% e RT de 3,51 (figura 1) e a mãe, uma fração de Hb A<sub>2</sub> aumentada, com porcentagem de 12,0 e RT de 3,49 além de uma fração na janela de Hb D com 79,4% e RT de 4,30, como pode ser observado na figura 2. A cromatografia, com o uso da HPLC, no sistema VARIANT, fornece dados quantitativos das hemoglobinas variantes, mesmo que estas estejam presentes em pequenas quantidades. As janelas com os tempos de retenção de cada amostra

permitem a identificação de algumas variantes de hemoglobinas, tornando-se um método importante para o diagnóstico diferencial das hemoglobinopatias. Apesar da Hb Lepore não ser eluída em janela própria, e sim na janela de Hb A<sub>2</sub>, sua presença é indicada pela porcentagem elevada nessa janela, pelos resultados de testes anteriores e pelo perfil cromatográfico, que é característico para esta hemoglobina anormal.

A análise molecular para identificação da Hb D-Los Angeles foi realizada através da amplificação do éxon 3 do gene da globina beta e digestão enzimática pela enzima de restrição *EcoRI*, objetivando a análise dos RFLP em gel de poliacrilamida. Desse modo, pode-se observar 3 fragmentos: um fragmento de 296pb e outro de 268pb correspondentes ao alelo sem a mutação e 564pb do alelo mutante, que não foi digerido pela enzima.

O correto diagnóstico laboratorial é de grande importância para as formas interativas de hemoglobinas, tendo em vista casos de associação de variantes que migram na mesma posição de Hb S em pH alcalino, como as Hb D-Los Angeles e Hb Lepore. Essa situação pode ser confundida como homozigose para Hb S. A ocorrência de tais associações exige, portanto, que todos os recursos diagnósticos, em nível laboratorial sejam utilizados, em benefício do paciente e seus familiares. O esclarecimento diagnóstico destes casos é fundamental, tanto para o correto aconselhamento genético quanto para evitarem-se tratamentos inadequados ou desnecessários dos seus portadores.

A co-herança de Hb Lepore e outras variantes com ou sem fenótipo talassêmico tem sido relatada, como por exemplo, com Hb C, Hb J Oxford, Hb J Peterborough, Hb Knossos, Hb S e Hb E<sup>(3)</sup>. Entretanto, ainda não há registros na literatura da associação de Hb Lepore e Hb D-Los Angeles. Essa parece ser a primeira descrição desta associação na população brasileira.

## **Agradecimentos**

Nós agradecemos à BIO-RAD, BIO-OXFORD pela assistência técnico-científica. Ao Dr. Gustavo O. B. Rodriguez, Hamilton Cabral e Fábio R. Lombardi pelo auxílio durante esse trabalho. À profa. Érika Stupiello pela revisão no Abstract.

## **Referências bibliográficas**

1. Baglioni, C. The fusion of two peptide chains in hemoglobin Lepore and its interpretation as a genetic deletion. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, 48: 1880-1886, 1962.
2. Ropero, P. et al. Identification of the Hb Lepore phenotype by HPLC. **Haematologica**, 84: 1081-1084, 1999.
3. Viprakasit, V. et al. Complex interactions of  $\delta\beta$  hybrid haemoglobin (Hb Lepore-Hollandia) Hb E ( $\beta$  G  $\Pi$  A) and  $\alpha$ -thalassaemia in a Thai family. **Eur. J. Haematol.**, 58: 107-112, 2002.
4. Murad, A.M. Associação das Hemoglobinas S-Lepore. **JBM**, 63: 164-167, 1992.
5. White, J.M. et al. Synthesis of haemoglobin Lepore. **Nature New Biol.**, 235: 208-210, 1972.
6. Miranda, S.R.P. et al. Hb Lepore Baltimore ( $\delta$ 50Ser $\beta$ 86Ala) identified by DNA analysis in a Brazilian family. **Acta Haematol.**, 91: 7-9, 1994.
7. Vella, F.; Lehmann, H. Haemoglobin D Punjab (D Los Angeles). **J. Med. Genet.**, 11: 341-348, 1974.

8. Politis-Tsegos, C. et al. Homozygous haemoglobin D Punjab. **J. Med. Genet.**, 12: 269-274, 1975.
9. Perea, F.J. et al. Hb D-Los Angeles associated with Hb S or  $\beta$ -thalassemia in four Mexican mestizo families. **Hemoglobin**, 23: 231-237, 1999.
10. Fodor, F.H.; Eng, C.M. Molecular exclusion of haemoglobin SD disease by prenatal diagnosis. **Prenat. Diagn.**, 19: 58-60, 1999.
11. Leoneli, G.G. **Hemoglobina D – Caracterização eletroforética e molecular**. 2001.107f. Dissertação (Mestrado em Genética). Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas – UNESP, São José do Rio Preto-SP.
12. Silvestroni, E.; Bianco, I. Screening for microcytemia in Italy: analysis of data collected in the past 30 years. **Am. J. Hum. Genet.**, 27: 198-212, 1975.
13. Bonini-Domingos, C.R. **Prevenção das hemoglobinopatias no Brasil - Diversidade Genética e Metodologia Laboratorial**. 1993. 144f. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista – UNESP, São José do Rio Preto-SP.
14. Marengo-Rowe, A.J. Rapid electrophoresis and quantitation of haemoglobin on cellulose acetate. **J. Clin. Path.**, v.18, p.790-792, 1965.
15. Vella, F. Acid agar gel electrophoresis of human hemoglobin. **Am. J. Clin. Path.**, 49(3): 440-442, 1968.
16. Schneider, R.G. Differentiation of electrophoretically hemoglobins - such as S, D ou G and P or A<sub>2</sub>, C, E and O – by electrophoresis of the globin chains. **Clin. Chem**, 20: 1111-1115, 1974.

17. Pena, S.D.J. et al. DNA bioprints: simple non-isotopic DNA fingerprints with biotinylated probes. **Electrophoresis**, 12: 146-152, 1991.

18. Saiki, R.K et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science**, 230: 487-491, 1988.

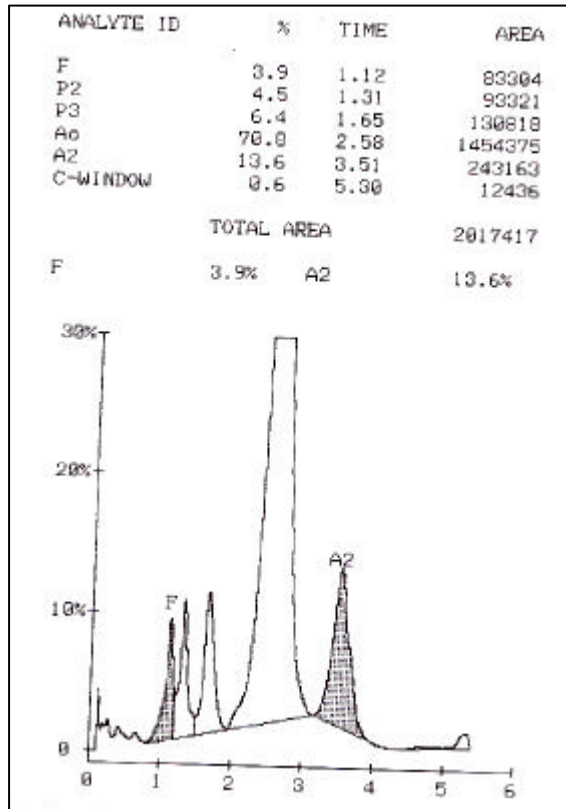


Figura 1: Cromatograma obtido por HPLC no equipamento VARIANT (BIO-RAD) a partir da amostra de sangue do probando, portador de Hb Lepore.

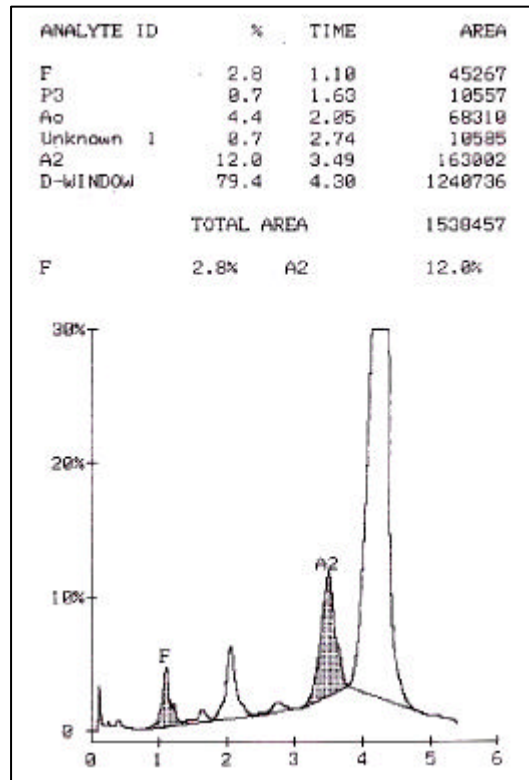


Figura 2: Cromatograma obtido por HPLC no equipamento VARIANT (BIO-RAD) a partir de amostra de sangue da mãe, com as variantes Lepore e D-Los Angeles.

Este artigo será submetido à Genetics and Molecular Biology  
ISSN: 1415-4757

## **Associação de metodologias clássicas e moleculares para confirmação da Hemoglobina E em doador de sangue**

Chinelato-Fernandes, A.R.<sup>1</sup>, Oliveira, R.B.O.<sup>2</sup>, Staedele, A.D.<sup>3</sup>, Padilha Filho, O.<sup>4</sup>,  
Bonini-Domingos, C.R.<sup>5</sup>

- 1. Laboratório de Hemoglobinas e Genética das Doenças Hematológicas (LHGDH). Mestre em Genética pelo programa de Pós-Graduação do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, UNESP – São José do Rio Preto - SP.*
- 2. Bioquímica do Laboratório de Hematologia do Centro de Hematologia e Hemoterapia de Santa Catarina – Fundação de Apoio ao Hemosc e Cepon – Fahece.*
- 3. Bioquímica do Laboratório de Hematologia do Centro de Hematologia e Hemoterapia de Santa Catarina – Fundação de Apoio ao Hemosc e Cepon – Fahece.*
- 4. Bioquímico do Laboratório de Hematologia do Centro de Hematologia e Hemoterapia de Santa Catarina – Fundação de Apoio ao Hemosc e Cepon – Fahece.*
- 5. Professora Doutora responsável pelo Laboratório de Hemoglobinas e Genética das Doenças Hematológicas (LHGDH), do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, UNESP – São José do Rio Preto - SP.*

Endereço para correspondência:

Ana Regina Chinelato Fernandes

IBILCE - UNESP

R. Cristóvão Colombo, 2265

CEP:15054-000

São José do Rio Preto - SP

Fone: (17) 221 2392

Fax: (17) 224 6355

e-mail: [ar.chinelato@uol.com.br](mailto:ar.chinelato@uol.com.br)

## **Resumo**

A Hb E é originada pela mutação GAG → AAG no códon 26 da globina beta, que leva à uma substituição do ácido glutâmico por lisina no produto gênico. Na eletroforese em acetato de celulose, pH alcalino, essa variante migra de forma semelhante à Hb C e Hb A<sub>2</sub> e sua diferenciação deve ser iniciada por eletroforese em pH ácido. Além desses procedimentos eletroforéticos, foi realizada a eletroforese de cadeias globínicas em acetato de celulose, pH alcalino, cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) e a análise molecular através da reação em cadeia da polimerase e hibridação com oligonucleotídeos alelo específicos (PCR-ASO), para a caracterização da fração anormal. A Hb E é comum no sudeste da Ásia e regiões do subcontinente Indiano. No Brasil, poucos casos foram descritos e relatados na literatura, indicando baixa frequência. A co-herança com talassemia beta ou outras variantes pode levar à anemias graves e o correto diagnóstico e aconselhamento genético devem ser realizados, para minimizar o desconhecimento sobre as anormalidades de hemoglobinas no Brasil.

Palavras chaves: Hemoglobina E, hemoglobinopatias, Diagnóstico laboratorial.

## **Abstract**

Hb E is originated by the GAG  $\rightarrow$  AAG mutation at codon 26 of the beta globin gene, resulting in the replacement of glutamic acid for lysine in genetic product. On cellulose acetate electrophoresis, alkaline pH migrates similarly to Hb C and Hb A<sub>2</sub> and its differentiation shall be started by electrophoresis in acid pH. In addition to these electrophoretic procedures, electrophoresis of the globin chains in cellulose acetate, alkaline pH, high performance liquid chromatography (HPLC) and the molecular analysis through polymerase chain reaction and allele-specific oligonucleotide hybridization (PCR-ASO) for characterization of the abnormal fraction. This hemoglobin is common in Southeast Asia and parts of the Indian subcontinent. In Brazil, few cases have been described and reported in literature, indicating low frequency.

Co-inheritance with  $\beta$ -thalassemia and other variants could lead to severe anemia and the correct diagnosis and genetic counseling shall be carried out in order to minimize the unawareness of these hemoglobin abnormalities in Brazil.

**Keywords:** Hemoglobin E, Hemoglobinopathies, Laboratorial diagnosis.

## Introdução

A Hb E foi descrita pela primeira vez por Chernoff e colaboradores em 1954 na Tailândia<sup>(1,2)</sup>. É originada pela mutação GAG → AAG no códon 26 da globina beta, que leva à uma substituição do ácido glutâmico por lisina no produto gênico. Na eletroforese em acetato de celulose, pH alcalino, essa variante migra de forma semelhante à Hb C e Hb A<sub>2</sub> e a diferenciação deve ser iniciada por eletroforese em pH ácido<sup>(2,3)</sup>. Apesar de ser uma variante de hemoglobina, o fenótipo dos portadores se assemelha ao dos beta talassêmicos, já que a mutação para Hb E cria um sítio de *splicing* anormal, reduzindo drasticamente a formação do mRNA da globina<sup>(3,4,5)</sup>.

Os heterozigotos geralmente são assintomáticos; no entanto, a presença de microcitose e algumas células em alvo podem ser notada. Os indivíduos homozigotos apresentam anemia moderada, com algumas células em alvo<sup>(2)</sup>. Os indivíduos que herdaram a Hb E e talassemia beta apresentam manifestações clínicas variáveis, desde indivíduos com sintomas brandos, até anêmicos crônicos severos, com retardo no crescimento, hepatoesplenomegalia com sobrecarga de ferro e dependência de transfusão<sup>(1,6,7)</sup>, tornando-se um dos maiores problemas de saúde pública nos países que apresentam altas frequências para essa hemoglobinopatia.

É muito comum no sudeste da Ásia e regiões do subcontinente Indiano, alcançando uma frequência maior que 50% em certas regiões da Tailândia, Laos e Camboja<sup>(8,9,10,11)</sup>.

No presente trabalho foi descrito um indivíduo, doador de sangue portador de Hb E identificado por procedimentos eletroforéticos, cujo diagnóstico foi confirmado por testes cromatográficos e moleculares.

## Material e Métodos

O probando, um rapaz, doador de sangue, com características de afro-descendente e valores hematimétricos dentro da faixa de normalidade (tabela 1) foi pesquisado para confirmação do diagnóstico de alterações de hemoglobinas, cuja suspeita foi inicialmente sugerida por eletroforese em pH alcalino. O sangue foi coletado em frasco estéril com anticoagulante EDTA 5%, após consentimento informado. Foram realizados testes de triagem de hemoglobinopatias, que consistiram de resistência globular osmótica em solução de NaCl a 0,36%<sup>(12)</sup>, análise da morfologia eritrocitária à fresco<sup>(13)</sup> e eletroforese alcalina em acetato de celulose utilizando-se tampão Tris-EDTA-Borato em pH 8,5<sup>(14)</sup>. Como procedimento de confirmação, foram realizadas as eletroforeses em ágar com tampão fosfato pH 6,2<sup>(15)</sup>; de cadeias globínicas em acetato de celulose com tampão Tris-EDTA-Borato, uréia e mercaptoetanol<sup>(16)</sup>, focalização isoeletrica<sup>(17)</sup> e cromatografia líquida de alta pressão (HPLC), com o equipamento VARIANT (BIO-RAD Laboratories), utilizando-se o kit de diagnóstico para talassemia beta heterozigota.

Para as análises moleculares, o DNA foi obtido dos glóbulos brancos através do método de extração fenólica<sup>(18)</sup>. Para o diagnóstico da hemoglobina E, foi realizado o teste molecular por PCR e oligonucleotídeos alelo específicos (ASO), com os kits *mD<sub>x</sub>*<sup>TM</sup> BeTha Gene 1 e BeTha Gene 2 (BIO-RAD Laboratories), que detectam respectivamente, 8 mutações de origem mediterrânea e 8 mutações de origem asiática mais comuns para talassemia beta, incluindo a mutação para Hb E.

## Resultados

A amostra de sangue do probando foi encaminhada ao LHGDH – IBILCE – UNESP pelo HEMOSC, Santa Catarina, após observação de uma fração anormal de hemoglobina. Nos testes de triagem, apresentou resistência globular osmótica positiva em solução de NaCl 0,36%. Alterações discretas na morfologia eritrocitária, como microcitose e hipocromia foram encontradas. Na eletroforese em acetato de celulose, pH alcalino, o probando apresentou uma fração de hemoglobinas na posição de Hb A e outra fração na posição de Hb C. Na eletroforese em pH ácido, observou-se uma fração na posição de Hb A e outra discreta na posição de Hb F. Pela eletroforese de cadeias globínicas, em pH alcalino, observou-se fração na posição próxima à globina  $\beta^C$ , pois as Hb C e Hb E, apresentaram migração semelhante neste pH. Na focalização isoelétrica visualizou-se uma banda na posição de Hb A e outra em posição semelhante à Hb C. Na HPLC, as maiores frações de hemoglobinas foram eluídas na janela de Hb A, com porcentagem de 61,8 e tempo de retenção (RT) de 2,74 e na janela de Hb A<sub>2</sub> com 31,1% e RT de 3,85, como pode ser observado na figura 1, além de discreta presença de Hb F. O perfil cromatográfico obtido sugere presença da variante eluída na janela de Hb A<sub>2</sub>.

Na análise molecular, a mutação para Hb E foi confirmada pela metodologia de PCR-ASO.

## Discussão

A eletroforese em acetato de celulose, pH alcalino é o método mais utilizado para a identificação de hemoglobinas; entretanto, sua sensibilidade é limitada, especialmente nos casos de co-migração de isoformas, como as hemoglobinas C e E. A diferenciação dessas variantes deve-se iniciar pela eletroforese em gel de ágar, pH ácido.

A cromatografia, com o uso da HPLC, no sistema VARIANT (BIO-RAD Laboratories), fornece dados quantitativos das hemoglobinas variantes, mesmo que estas estejam presentes em pequenas quantidades. Algumas variantes são eluídas em janelas próprias, como as Hb S, C e D. A Hb E não é eluída em janela própria, e sim juntamente com Hb A<sub>2</sub>; sua presença é portanto, indicada pela porcentagem elevada nessa janela, pelos resultados obtidos em testes anteriormente realizados e pelo perfil cromatográfico característico para essa hemoglobina anormal.

A metodologia PCR-ASO tornou-se uma ferramenta útil para a análise de hemoglobinas anormais. Para tal procedimento, o DNA genômico deve ser amplificado com *primers* específicos e a detecção de mutações é baseada na hibridação com um oligonucleotídeo alelo específico sintético que formará um dúplex estável com a sequência de DNA alvo, somente se todos os pares de base no dúplex forem perfeitamente pareados. Os kits utilizados identificam 16 mutações mais comuns, 8 de origem mediterrânea e 8 de origem asiática, incluindo a mutação que origina a Hb E.

Nota-se que a combinação de várias técnicas, clássicas e moleculares, parece ser necessária para a identificação acurada das variantes de hemoglobinas, uma vez que cada uma das técnicas citadas, isoladamente, apresentam limitações na identificação das hemoglobinas anormais, pois a co-migração pode subestimar a frequência de algumas variantes<sup>(19)</sup>.

A distribuição geográfica da Hb E e das talassemias se sobrepõe à distribuição da malária. Vários estudos indicam um efeito protetor da Hb E contra o *P. falciparum*<sup>(9)</sup> semelhante aos efeitos atribuídos para Hb S, conhecida como a

Hipótese da malária<sup>(23)</sup>. Entretanto, em algumas regiões do mundo a malária e essas variantes nunca coexistiram<sup>(24)</sup>.

A Hb E é uma das variantes de maior frequência nos países asiáticos e para alguns pesquisadores essa alta frequência pode ser atribuída à forte seleção em favor da Hb E contra a malária. Atualmente sua distribuição tem aumentado devido ao fluxo migratório desses indivíduos para a Europa, América do Norte e Austrália<sup>(1)</sup>. O Brasil foi inicialmente colonizado por portugueses no XVI, período em que teve início a miscigenação entre colonizadores e ameríndias nativas. Posteriormente, com o tráfico de escravos, o negro passou a ser o principal grupo de miscigenação com o branco. Somente nos séculos XIX e XX, o país passou a receber imigrantes de diversas nacionalidades, principalmente européias, mas também asiáticas e do oriente médio<sup>(20)</sup>. Atualmente, a população brasileira caracteriza-se por apresentar grande heterogeneidade genética, derivada da contribuição que lhes deram os seus grupos raciais formadores e dos diferentes graus com que se inter cruzaram nas várias regiões do país<sup>(21, 22)</sup>.

Desse modo, a frequência da variante E ainda é baixa no Brasil, mas tem aumentado devido ao crescente fluxo de imigrantes dos países asiáticos para o nosso país. Além disso, as melhorias nas metodologias laboratoriais clássicas, associadas aos métodos moleculares para detecção e caracterização de hemoglobinas variantes, resultam em diagnósticos mais precisos, beneficiando os pacientes e seus familiares.

Os indivíduos heterozigotos geralmente são assintomáticos; no entanto, a presença de microcitose e algumas células em alvo podem ser notada. Icterícia e febre, além de esplenomegalia podem ser observadas. Os indivíduos homozigotos apresentam anemia moderada, com algumas células em alvo<sup>(2)</sup>. Nos países asiáticos, além da Hb E, a talassemia beta também apresenta frequência elevada, de modo que a herança dessas duas hemoglobinopatias não é rara. As manifestações clínicas são variáveis, desde indivíduos com sintomas brandos, até anêmicos crônicos severos, com retardo no crescimento, hepatoesplenomegalia com sobrecarga de ferro e dependência de transfusão<sup>(1,6,7)</sup>. Nesses países, a associação de Hb E/talassemia beta tornou-se um dos principais problemas de

saúde pública<sup>(11)</sup>. Técnicas de diagnóstico pré-natal e *screening* neonatal podem ser ferramentas úteis para a prevenção e controle das hemoglobinopatias nessa região do mundo. Além disso, o aconselhamento genético para os pais portadores dessa variante e talassemia beta deve ser preconizado.

O portador da mutação diagnosticada apresenta características de afro-descendente, e os resultados obtidos refletem a diversidade genética da população brasileira, com influência de intensa miscigenação. Os estudos moleculares de hemoglobinas fundamentam a importância do conhecimento destas alterações em nossa população, visando a real prevalência de hemoglobinas anormais e sua relação com as características fenotípicas dos portadores.

## **Agradecimentos**

Nós agradecemos à BIO-RAD, BIO-OXFORD pela assistência técnico-científica. Agradecemos também à Profa. Érika Stupiello pela correção do Abstract.

## **Referências bibliográficas**

1. Rees, D.C.; Clegg, J.B.; Weatherall, D.J. Is hemoglobin instability important in the interaction between hemoglobin E and  $\beta$  thalassemia? **Blood**, 92(6): 2141-2146, 1998.
2. Piplani, S. Hemoglobin E disorders in the North East India. **JAPI**, 48(11): 1082-1084, 2000.
3. Steger, H. et al. Hemoglobin E and codon 17 nonsense: two  $\beta$ -globin gene mutation common in Southeast Asia detected by the use of ARMS. **Ann. Hematol.**, 67: 119-120, 1993.
4. Bandyopadhyay, A. et al. Major beta-globin gene mutations in Eastern India and their associated haplotypes. **Hum. Hered.**, 49: 232-235, 1999.
5. Shirohzu, H. et al. Repression of aberrant splicing in human beta-globin pre-mRNA with HbE mutation by antisense oligoribonucleotide or splicing factor SF2/ASF. **Int. J. Hematol.**, 72: 28-33, 2000.
6. Fucharoen, S. et al. Clinical manifestation of  $\beta$ -thalassemia/hemoglobin E disease. **J. Ped. Hemat. Oncol.** 22(6): 552-557, 2000.
7. Olivieri, N.F. et al. Iron overload and iron-chelating therapy in hemoglobin E- $\beta$  Thalassemia. **J. Ped. Hemat. Oncol.**, 22(6): 593-597, 2000.

8. Pillers, D.M. et al. Hb Hope [ $\beta$ 136(H14)Gly  $\rightarrow$  Asp] and Hb E [ $\beta$ 26(B8) Glu  $\rightarrow$  Lys]: compound heterozygosity in a Thai Mien family. **Hemoglobin**, 16(1-2): 81-84, 1992
9. Fucharoen, G. et al. Frequency distribution and haplotypic heterogeneity of  $\beta^E$ -globin gene among eight minority groups of Northeast Thailand. **Hum. Hered**, 53: 18-22, 2002.
10. Thein, S. L. et al. Direct detection of haemoglobin E with synthetic oligonucleotides. **Lancet**, 11: 93, 1986.
11. Pung-Amritt, P. et al. Prevalence of Hb E from cord blood samples and after one year follow-up. **Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health**, 30: 97-99, 1999.
12. Silvestroni, E.; Bianco, I. Screening for microcytemia in Italy: analysis of data collected in the past 30 years. **Am. J. Hum. Genet.**, 27: 198-212, 1975.
13. Bonini-Domingos, C. R. **Prevenção das hemoglobinopatias no Brasil - Diversidade Genética e Metodologia Laboratorial**. 1993. 144f. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Biociências, Letras e Ciência Exatas, Universidade Estadual Paulista – UNESP, São José do Rio Preto-SP.
14. Marengo-Rowe, A. J. Rapid electrophoresis and quantitation of haemoglobin on cellulose acetate. **J. Clin. Path.**, 18: 790-792, 1965.
15. Vella, F. Acid agar gel electrophoresis of human hemoglobin. **Am. J. Clin. Path.**, 49(3): 440-442, 1968.

16. Schneider, R. G. Differentiation of electrophoretically hemoglobins - such as S, D ou G and P or A<sub>2</sub>, C, E and O – by electrophoresis of the globin chains. **Clin. Chem**, 20: 1111-1115, 1974.
17. Naoum, P.C. **Eletroforese - Técnicas e Diagnósticos**. 2<sup>a</sup> edição. Santos Livraria Editora, 1999. 154 p.
18. Pena, S. D. J. et al. DNA bioprints: simple non-isotopic DNA fingerprints with biotinylated probes. **Electrophoresis**, 12: 146-152, 1991.
19. Moscoso, H. et al. Enzyme immunoassay for the identification of hemoglobin variants. **Hemoglobin**, 14(4): 389-398, 1990.
20. Salzano, F.M., Freire-Maia, N. **Populações brasileiras: aspectos demográficos, genéticos e antropológicos**. São Paulo, EDUSP, 1967. 177p.
21. Naoum, P.C. et al. Hemoglobinopatias no Brasil. **Boletim**, 8(141): 180-188, 1986.
22. Salzano, F.M. O apoio da genética à história dos brasileiros. **Pesquisa FAPESP**, 58: 32-35, 2000.
23. Clegg, J.B.; Weatherall D.J. Thalassemia and malaria: new insights into na old problem. **Proc. Assoc. Am. Physicians**, 111: 278-282, 1999.
24. Flint, J. et al. The population genetics of the haemoglobinopathies. **Baillieres Clin. Haematol.** 11: 1-51, 1998.

Tabela 1: Resultados hematológicos obtidos da amostra de sangue do probando, portador de Hb E, por equipamento automatizado

<b>Teste</b>	<b>Resultados</b>	<b>Valores Normais</b>	<b>Unidades</b>
N <sup>o</sup> Eritrócitos	5.05	4.2 – 6.1	X10 <sup>6</sup> /μL
Hemoglobinas	13.4	12 - 18	g/dL
Hematócrito	40.9	37 - 52	%
Volume corpuscular médio	81.0	80 - 99	fL
Distribuição de tamanhos dos eritrócitos	13.3	11.5 – 14.5	%
Plaquetas	271	130 – 400	x10 <sup>3</sup> /μL
Neutrófilos	50.0	40 - 74	%
Linfócitos	40.3	19 - 48	%
Monócitos	4.4	3.4 - 9	%
Eosinófilos	1.2	0 - 7	%
Basófilos	0.8	0 – 1.5	%
Reticulócitos	1.5	0.5 – 2.5	%

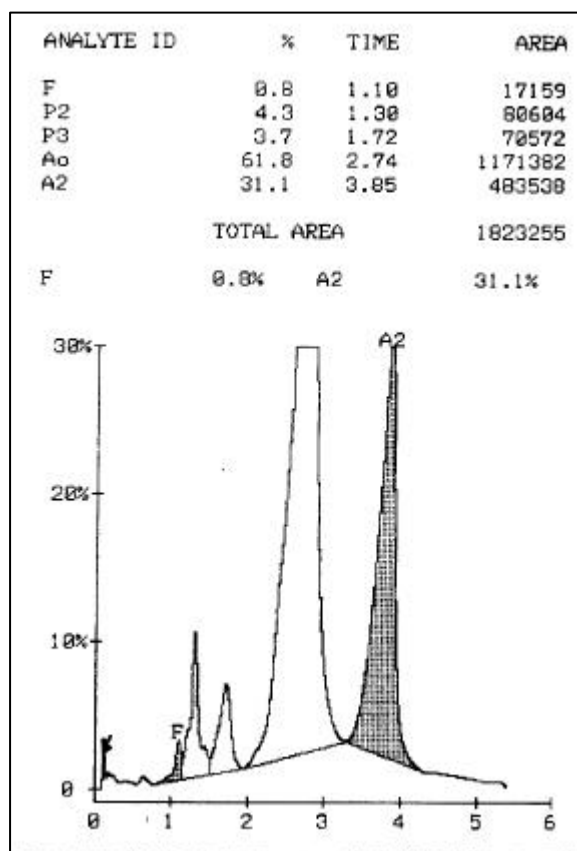


Figura 1: Cromatograma obtido por HPLC no equipamento VARIANT (BIO-RAD) a partir de amostra de sangue do probando.

Este artigo será submetido à Clinical Chemistry  
ISSN: 0009-9147

## **Utilização de diferentes metodologias de análise na caracterização da heterozigose para Hb Hasharon**

Chinelato-Fernandes, A.R.<sup>1</sup>, Mendiburu, C.F.<sup>2</sup>, Bonini-Domingos, C.R.<sup>3</sup>

*1. Laboratório de Hemoglobinas e Genética das Doenças Hematológicas (LHGDH). Mestre em Genética pelo programa de Pós-Graduação do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, UNESP – São José do Rio Preto - SP.*

*2. Licenciado em Genética pela Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales de la Universidad Nacional de Misiones - Argentina.*

*3. Professora Doutora responsável pelo Laboratório de Hemoglobinas e Genética das Doenças Hematológicas (LHGDH), do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, UNESP – São José do Rio Preto - SP.*

Endereço para correspondência:

Ana Regina Chinelato Fernandes

IBILCE - UNESP

R. Cristóvão Colombo, 2265

CEP:15054-000

São José do Rio Preto - SP

Fone: (17) 221 2392

Fax: (17) 224 6355

e-mail: [ar.chinelato@uol.com.br](mailto:ar.chinelato@uol.com.br)

## **Resumo**

A Hb Hasharon migra de forma semelhante à Hb S em eletroforese em acetato de celulose, pH 8,5 e entre as Hb S e C em pH ácido. Na cromatografia líquida de alta pressão (HPLC), possui perfil cromatográfico e tempo de retenção (RT) específicos. A origem dessa mutação é a transversão GAC  $\rightarrow$  CAC no códon 47 do gene alfa 2, resultando na substituição da asparagina por histidina.

Foram analisadas 10 amostras de sangue de indivíduos com suspeita de serem portadores de Hb Hasharon. Além dos procedimentos eletroforéticos clássicos, e análise por HPLC, foi realizada a análise molecular pela reação em cadeia da polimerase e análise dos polimorfismos de comprimento dos fragmentos de restrição (PCR-RFLP), que confirmou a mutação.

Esse caso demonstra que a associação de metodologias clássicas e moleculares se faz necessária, pois permite a correta identificação do mutante. A identificação acurada das variantes de hemoglobinas é essencial para o aconselhamento genético e adoção de medidas terapêuticas.

Palavras-chaves: Hb Hasharon, Diagnóstico laboratorial, Variantes de hemoglobina.

## **Abstract**

Hb Hasharon has presented electrophoretic mobility similar to Hb S in cellulose acetate and between Hb S and C at acid pH. In high performance liquid chromatography (HPLC), it has presented specific chromatographic profile and retention time. The origin of this variant is the GAG  $\rightarrow$  CAC mutation at codon 47 of alfa2-globin gene, resulting in the replacement of asparagine for histidine during the translation process.

10 blood samples of individuals suspect of being Hb Hasharon carriers have been analyzed. Beyond classic laboratorial and HPLC analysis, molecular analysis by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) were performed to confirm this mutation.

The association of classic and molecular methodology is necessary because of correct mutant identification. The accurate identification of the hemoglobin variants is essential for genetic counseling and therapeutic measures.

**Keywords:** Hb Hasharon, Laboratorial diagnosis, Hemoglobin variants.

## Introdução

Mais de 800 variantes estruturais de hemoglobinas já foram descritas, a maioria delas originada por substituições que não alteram a carga elétrica total da proteína; dessa forma, inúmeras variantes apresentam comigração em eletroforese em pH alcalino, como as Hb S e D<sup>(1, 2)</sup>. A Hb Hasharon migra de forma semelhante à Hb S em eletroforese em acetato de celulose, pH 8,5. Entretanto, na eletroforese em pH ácido, essa variante migra entre as Hb S e C<sup>(3)</sup>. Na cromatografia líquida de alta pressão (HPLC), possui perfil cromatográfico e tempo de retenção (RT) específicos do sistema VARIANT (BIO-RAD Laboratories) de análise.

A origem dessa mutação é uma troca na primeira base da trinca GAC  $\Pi$  CAC no códon 47 do gene alfa 2. Na proteína, essa alteração leva à uma substituição da asparagina por histidina. Os indivíduos heterozigotos são assintomáticos e essa variante apresenta maior ocorrência em judeus Ashkenazi e italianos<sup>(3)</sup>.

## Material e Métodos

Foram analisadas 10 amostras de sangue periférico, sendo cinco provenientes de indivíduos do sexo masculino e cinco do sexo feminino, com idades que variaram de sete meses até 27 anos. O sangue foi coletado em frasco estéril com anticoagulante EDTA 5%, após consentimento informado. Essas amostras, provenientes na sua maioria do estado de São Paulo, foram encaminhadas ao Laboratório de Hemoglobinas e Genética das Doenças Hematológicas (LHGDH) – IBILCE - UNESP, com suspeita de hemoglobinas anormais e perfil eletroforético compatível com Hb AS. Para a determinação da variante de hemoglobinas, foram realizados testes de triagem, que consistiram de resistência globular osmótica em solução de NaCl a 0,36%<sup>(4)</sup>, análise da morfologia eritrocitária à fresco<sup>(5)</sup> e eletroforese alcalina em acetato de celulose utilizando-se tampão Tris-EDTA-Borato em pH 8,5<sup>(6)</sup>. Como procedimento de confirmação, foram realizadas as eletroforeses em ágar com tampão fosfato pH 6,2<sup>(7)</sup>; de cadeias globínicas em acetato de celulose com tampão Tris-EDTA-Borato, uréia e mercaptoetanol<sup>(8)</sup>. A cromatografia líquida de alta pressão (HPLC), com o equipamento VARIANT (BIO-RAD), utilizando-se o kit de diagnóstico para talassemia beta heterozigota (BTS), permitiu a identificação dos conteúdos hemoglobínicos e sua quantificação.

Para as análises moleculares, o DNA foi obtido dos glóbulos brancos através do método de extração fenólica<sup>(9)</sup> e o éxon 2 da globina alfa foi amplificado através da reação em cadeia da polimerase<sup>(10)</sup>. A sequência de primers utilizada na reação de amplificação foi: Primer sense – 5' AGG CCC

TGG AGA GGT GAG 3' e Primer anti-sense – 5' GGA GCT GTG CAG AGA  
AGA GG 3'. Do produto amplificado, cinco microlitros foram digeridos com a  
endonuclease de restrição *Taq****a****I* de acordo com as instruções fornecidas pelo  
fabricante e o produto da digestão submetido à eletroforese em gel de agarose  
corado com brometo de etídio, para observação das bandas mutantes e/ou  
normais. O fragmento amplificado é de 481pb; o alelo normal é digerido em três  
fragmentos - 117pb, que é o controle de ação da enzima e outros dois fragmentos,  
de 175pb e 189pb. O alelo mutante têm o sítio de restrição entre os fragmentos  
de 175pb e 189pb abolido, resultando, portanto, em um único fragmento de  
364pb, além do fragmento controle de 117pb.

## Resultados

Nos testes de triagem, todas as amostras apresentaram resistência osmótica negativa em solução de NaCl 0,36%. Com relação à morfologia eritrocitária, as amostras apresentaram alterações discretas, como microcitose e hipocromia. Na eletroforese em acetato de celulose, pH alcalino, as amostras apresentaram uma fração hemoglobínica na posição de Hb A e outra semelhante à Hb S.

Nas análises eletroforéticas em pH ácido, as amostras apresentaram uma fração na posição de Hb A e outra banda na posição semelhante à Hb S ou ligeiramente abaixo.

Todas as amostras apresentaram uma fração na posição de mutante de globina alfa pela eletroforese de cadeias globínicas, com exceção da amostra AR-015, que não foi avaliada por esse teste, pela pouca quantidade de sangue enviada.

Na tabela 1 encontram-se os dados da análise por HPLC com o kit de diagnóstico para talassemia beta heterozigota (BTS) e equipamento VARIANT (BIO-RAD). Além das frações de hemoglobinas encontradas em indivíduos normais, como Hb F, P2, P3, A0 e A2, as amostras analisadas apresentaram pequenas frações nas janelas das variantes D, S e C e frações maiores, correspondentes às frações de Hb Hasharon, que foram eluídas em janelas reconhecidas como desconhecidas (Desc. 1 e 2). Pode-se notar que a maioria das amostras foram eluídas na “janela desconhecida 1”, com média da porcentagem de 27,85, desvio padrão de 1.85 e tempo de retenção (RT) de 4.80. Na amostra AR-146 a Hb Hasharon foi eluída na “janela desconhecida 2”, com 28,5% e RT de 4.80. O perfil cromatográfico de uma das amostras analisadas pode ser observado na figura 1.

As confirmações moleculares para Hb Hasharon foram realizadas por amplificação do éxon 2 da globina alfa pelo método de PCR e análise dos fragmentos após digestão com a endonuclease de restrição *Taq****I***. AR-186 não apresentou resultado positivo quanto à amplificação, apesar da presença de material genético no momento da quantificação do DNA e das várias tentativas de amplificação. Assim, nove amostras com suspeita de Hb Hasharon apresentaram o padrão esperado para essa variante em heterozigose, ou seja, quatro fragmentos: um de 117pb, que é o controle de ação enzimática, os fragmentos de 175pb e 189pb correspondentes ao alelo normal e outro fragmento de 364pb que corresponde ao alelo portador da mutação para Hb Hasharon. A mutação na primeira base da trinca, na posição 47 retira o sítio específico para a endonuclease de restrição *Taq****I***; dessa forma, não há digestão enzimática nessa região do DNA.

## Discussão

A eletroforese de hemoglobinas em acetato de celulose, pH alcalino é o método mais usado na maioria dos laboratórios para a identificação de hemoglobinas anormais; entretanto, sua sensibilidade é limitada, especialmente no caso de variantes que apresentam cargas elétricas semelhantes nesse pH, como as Hb S, D, G-Philadelphia e Hasharon<sup>(11)</sup>. As eletroforeses ácida e de cadeias globínicas podem auxiliar na diferenciação. As hemoglobinas do tipo D e G migram como Hb A em gel de ágar, pH ácido e a Hb Hasharon apresenta uma fração próxima da Hb S, geralmente em posição intermediária, entre Hb S e C nesse pH. Através da eletroforese de cadeias globínicas, pH alcalino, pode-se diferenciar as hemoglobinas anormais mutantes de cadeia beta como as Hb S e D, das variantes de cadeia alfa, como as Hb G-Philadelphia e Hasharon. Apesar dessas variantes diferirem quanto ao padrão de migração eletroforética em pH ácido, pequenas variações podem ocorrer devido às condições do gel ou quantidade da amostra. Desse modo faz-se necessária a utilização de técnicas mais sensíveis para a correta identificação da Hb Hasharon.

O uso da HPLC para a análise de hemoglobinas tem aumentado nos últimos anos. O equipamento VARIANT e o kit de diagnóstico BTS identifica as Hb A<sub>2</sub> e F como padrões quantitativos e permite a determinação das hemoglobinas variantes mais comuns, como S, C, D e E, em seis minutos de análise por amostra de sangue. A identificação dessas variantes é baseada em tempos de retenção específicos em coluna de cromatografia de troca iônica, identificadas em “janelas” previamente estabelecidas pelo sistema<sup>(12)</sup>. É um método relativamente simples e rápido que fornece informações importantes para a caracterização dos componentes hemoglobínicos<sup>(13)</sup>. A Hb Hasharon não é eluída em “janela” específica e sim em uma “janela” que o aparelho identifica como desconhecida. Sua presença é indicada pelos resultados obtidos de testes laboratoriais anteriores, como o perfil eletroforético em diferentes pH, pelo tempo de retenção na HPLC, além da confirmação por biologia molecular.

Através da análise por PCR-RFLP, nove amostras apresentaram o padrão correspondente à heterozigose para Hb Hasharon.

Destaca-se assim, a importância da associação de metodologias clássicas e moleculares, uma vez que cada procedimento apresenta suas vantagens e limitações. A cromatografia líquida de alta pressão é um procedimento rápido e bastante sensível, tornando-se um método extremamente útil para a correta identificação das frações de hemoglobinas; entretanto, é necessário salientar a importância da análise detalhada das porcentagens das frações de hemoglobinas e principalmente dos tempos de retenção de cada fração comparadas com o perfil cromatográfico gerado a partir desses dados. A análise molecular deve ser realizada para a confirmação dos achados eletroforéticos e cromatográficos.

## Agradecimentos

Nós agradecemos à BIO-RAD, BIO-OXFORD pela assistência técnico-científica e à Profa. Érika Stupiello pela correção do Abstract.

## Referências bibliográficas

1. Grignoli, C.R.E. et al. Hb Rio Claro [ $\beta$ 34(B16) Val  $\Pi$  Met]: a novel electrophoretically silent variant found in association with Hb Hasharon [ $\alpha$ 47(CE5)Asp  $\Pi$  His] and  $\alpha$ -thalassemia-2 ( $-\alpha^{3.7}$ ). **Hemoglobin**, 23(2): 177-182, 1999.
2. Wajcman, H. et al. Abnormal hemoglobins: laboratory methods. **Hemoglobin**, 25(2), 169-181, 2001.
3. THALASSEMIA.com. <http://www.thalassemia.com/medical/definition.shtml>  
(Accessed: april 2002).
4. Silvestroni, E.; Bianco, I. Screening for microcytemia in Italy: analysis of data collected in the past 30 years. **Am. J. Hum. Genet.**, 27: 198-212, 1975.
5. Bonini-Domingos, C.R. **Prevenção das hemoglobinopatias no Brasil - Diversidade Genética e Metodologia Laboratorial**. 1993. 144f. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Biociências, Letras e Ciência Exatas, Universidade Estadual Paulista – UNESP, São José do Rio Preto-SP.
6. Marengo-Rowe, A.J. Rapid electrophoresis and quantitation of haemoglobin on cellulose acetate. **J. Clin. Path.**, v.18, p.790-792, 1965.

7. Vella, F. Acid agar gel electrophoresis of human hemoglobin. **Am. J. Clin. Path.**, 49(3): 440-442, 1968.
8. Schneider, R.G. Differentiation of electrophoretically hemoglobins - such as S, D ou G and P or A<sub>2</sub>, C, E and O – by electrophoresis of the globin chains. **Clin. Chem.**, 20: 1111-1115, 1974.
9. Pena, S.D.J. et al. DNA bioprints: simple non-isotopic DNA fingerprints with biotinnylated probes. **Electrophoresis**, 12: 146-152, 1991.
10. Saiki, R.K et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science**, 230: 487-491, 1988.
11. Hempe, J.M.; Craver, R.D. Separation of hemoglobin variants with similar charge by capillary isoelectric focusing: value of isoelectric point for identification of common and uncommon hemoglobin variants. **Electrophoresis**, 21: 743-748, 2000.
12. Riou, J. et al. Cation-exchange HPLC evaluated for presumptive identification of hemoglobina variants. **Clin. Chem.**, 43: 34-39, 1997.
13. Kutlar, F. et al. Usefulness of HPLC methodology for the characterization of combinations of the common  $\beta$  chain variants Hb S, C and O-Arab, and the  $\alpha$  chain variant Hb G-Philadelphia. **Hemoglobin**, 17(1): 55-66, 1993.

**Tabela 1: Porcentagens e tempo de retenção das frações de hemoglobinas nos indivíduos amostrados obtidos por HPLC**

Amostras	F*		P2		P3		A0		A2		D		S		Desc.1		Desc.2	
	%	TR	%	TR	%	TR	%	TR	%	TR	%	TR	%	TR	%	TR	%	TR
AR-015			0.9	1.34	3.3	1.68	59.3	2.44	1.8	3.64			0.7	4.41	30.6	4.86		
AR-061	3.3	1.10	3.6	1.32	2.7	1.68	61.6	2.55	2.0	3.64					29.9	4.80		
AR-138	0.3	0.95	4.3	1.32	5.8	1.65	58.9	2.65	2.1	3.62	0.7	4.26	1.4	4.64	26.7	4.80		
AR-146	0.6	1.11	3.5	1.32	3.4	1.66	60.6	2.63	1.9	3.62	0.7	4.25			0.7	4.67	28.5	4.80
AR-178	0.9	1.10	4.5	1.31	3.2	1.72	62.8	2.64	2.1	3.61	0.8	4.24			25.6	4.80		
AR-185	0.4	1.12	3.6	1.33	2.3	1.73	61.8	2.65	2.0	3.64	0.8	4.27			28.7	4.80		
AR-186	1.6	1.12	4.0	1.32	2.7	1.75	60.9	2.65	1.6	3.65	0.8	4.27			28.3	4.80		
AR-190	0.6	0.95	4.6	1.32	0.9	1.66	54.8	2.62	2.0	3.66	0.4	4.28	2.6	4.64	25.7	4.80		
AR-222	1.0	1.10	4.1	1.30	4.6	1.65	59.0	2.66	1.9	3.59			1.1	4.64	25.5	4.80		
AR-223	0.2	0.94	4.0	1.30	4.2	1.64	58.8	2.68	1.9	3.61	0.7	4.23	1.1	4.62	29.0	4.80		

\*F: Janela de Hemoglobina Fetal; P2: Janela de Hemoglobina A glicosilada; P3: Janela de Hemoglobina A acetilada; A0: Janela de Hemoglobina A; A2: Janela de Hemoglobina A<sub>2</sub>; D: Janela de Hemoglobina D; S: Janela de Hemoglobina S; Desc. 1 e 2 Janela de hemoglobinas identificadas como desconhecidas; %: Porcentagem de cada hemoglobina presente na amostra; TR: Tempo de retenção é o tempo transcorrido da injeção da amostra até o ápice do pico de hemoglobina, sendo específico para cada hemoglobina.

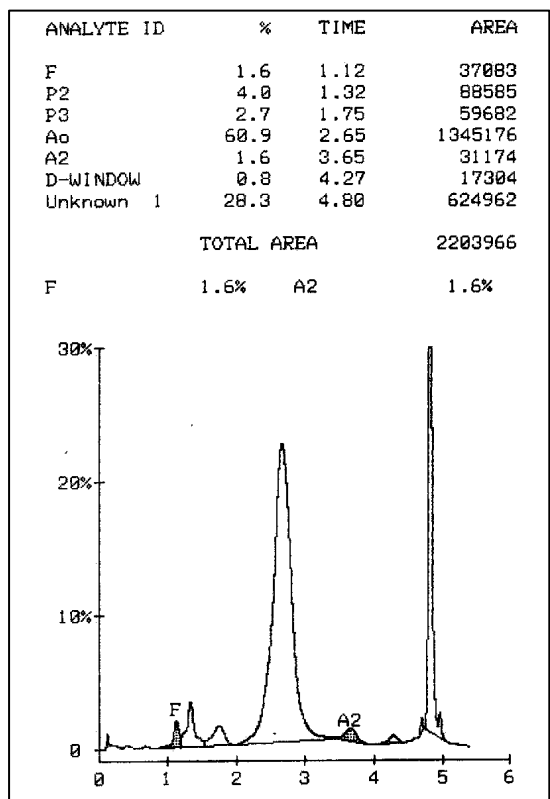


Figura 1: Cromatograma obtidos por HPLC sistema VARIANT (Bio-Rad) utilizando o programa BTS. A amostra apresenta o perfil heterozigoto para Hb Hasharon.

Conclusões

## **Conclusões**

Os resultados obtidos no presente estudo sobre as variantes de hemoglobinas corroboraram e ampliaram os conhecimentos sobre as hemoglobinas anormais encontradas no Brasil:

3 As metodologias clássicas de diagnóstico laboratorial aliadas as técnicas de biologia molecular devem ser utilizadas para a correta identificação de variantes de hemoglobinas, uma vez que cada metodologia utilizada isoladamente não apresenta sensibilidade adequada para o diagnóstico preciso.

3 Nas análises da variante D-Los Angeles foi encontrada média percentual de 35,44, além do estabelecimento dos valores de 4,1 e 4,32 como mínimo e máximo respectivamente para os tempos de retenção dessa fração pela HPLC, que está dentro dos limites estabelecidos pelo fabricante, porém em faixa mais restrita. Para Hb A<sub>2</sub> foi encontrada a média percentual de 2,62 com tempo de retenção mínimo de 3,49 e máximo de 3,8.

3 Várias associações foram descritas, como Hb D-Los Angeles e talassemia beta, Hb D-Los Angeles e Hb S e Hb D-Los Angeles e Hb Lepore. Ressaltamos em particular a associação de Hb D-Los Angeles e Hb Lepore, que pelo nosso conhecimento, é o primeiro caso descrito na população brasileira.

3 A descrição de um indivíduo, portador de Hb E, com características afro-descendente evidencia a grande diversidade genética da nossa população. Tal variante é comumente encontrada em indivíduos provenientes de países asiáticos. Poucos são os relatos sobre a Hb E no Brasil; entretanto, a melhoria das metodologias laboratoriais e a utilização da análise molecular para o correto diagnóstico podem revelar a real influência dos povos asiáticos na formação da população brasileira.

3 O diagnóstico molecular de Hb Hasharon foi padronizado pelo LHGDH e poderá ser utilizado para a identificação dessa variante. Além disso, esses dados confirmam a forte influência dos italianos na região sudeste.

3 A análise geral dos resultados indica um número grande de variantes que apresentam migração eletroforética semelhante à Hb S em pH alcalino. Tais variantes poderiam no passado, ter sido erroneamente diagnosticadas como Hb S, apenas pelos procedimentos eletroforéticos usuais, em pH alcalino.

3 O grande número de variantes encontradas revela a intensa miscigenação ocorrida na população brasileira, desde os primórdios de sua formação. As interações de hemoglobinas encontradas são as mais diversas e necessitam de diferentes recursos de diagnóstico laboratorial para que possam ser corretamente identificadas.

3 O esclarecimento diagnóstico é imprescindível, tanto para aqueles indivíduos portadores assintomáticos de variantes, como para os pacientes que apresentam associações. O aconselhamento genético poderá indicar aos casais portadores, o risco para a prole e evitar tratamentos inadequados ou desnecessários aos portadores de interações entre hemoglobinas anormais.

## Referências Bibliográficas

ADACHI, K et al. Facilitation of Hb S polymerization by the substitution of GLU for GLN at beta 121. **J. Biol. Chem.**, 263: 5607-5610, 1988.

AHMED, M. et al. The  $\beta$ -globin genotype E121Q/W15X (cd121GAA[CAAA/cd15TGG[ITGA) underlines Hb D/ $\beta$ -(0) thalassemia marked by domination of haemoglobin D. **Ann. Hematol.**, 80: 629-633, 2001.

AL-JAM'A, A.H. et al. Are we underestimating the leukemogenic risk of hydroxyurea. **Saudi Med. J.**, 23(11): 1411-1413, 2002.

ÁLVARES FILHO, F. **Variabilidade polimórfica de hemoglobinas humanas anormais em indivíduos das cidades de Barretos e de Colina, Estado de São Paulo: métodos de estudo e conscientização, prevalência e aconselhamento genético. 1987.** 120 f. Dissertação (Mestrado em Genética) - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto.

ARENDS, T. et al. Hemoglobin variants in the northeastern region of Venezuela. **Interciência**, 15(1): 36-41, 1990.

ATHANASIOU-METAXA, M. et al. Co-inheritance of Hemoglobin D-Punjab and Hemoglobin S: Case Report. **J. Ped. Hemat. Oncol.**, 24: 421-422, 2002.

BAGLIONI, C. The fusion of two peptide chains in hemoglobin Lepore and its interpretation as a genetic deletion. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, 48: 1880-1886, 1962.

BANDYOPADHYAY, A. et al. Major beta-globin gene mutations in Eastern India and their associated haplotypes. **Hum. Hered.**, 49: 232-235, 1999.

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 hemoglobins. **Blood**, 5(5): 971-982, 1978.

BONINI-DOMINGOS, C.R. **Prevalência de hemoglobinas anormais, fenótipo de haptoglobinas e quantificação de hemoglobinas A<sub>2</sub> e fetal em portadores de doença de Chagas. 1990.** 143f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto.

BONINI-DOMINGOS, C.R. **Prevenção das hemoglobinopatias no Brasil - Diversidade Genética e Metodologia Laboratorial. 1993.** 144f. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto.

CAO, A.; MOI, P. Regulation of the globin genes. **Pediatr. Res.**, 51(4): 415-421, 2002.

CARVALHO-SILVA, D.R. et al. The phylogeography of Brazilian Y-chromosome lineages. **Am .J. Hum. Genet.**, 68: 281-286, 2001.

CERON, C.R.; SANTOS, J.R. BICUDO, H.E.M.C. The use of gelatin to dry cellophane wound slab gels in na embroidering hoop. **Rev. Brasil. Genet.**, 15(1): 201-203, 1992.

CLARKE, G.M.; HIGGINS, T.N. Laboratory investigation of hemoglobinopathies and thalassemias: review and update. **Clin. Chem.**, 46(8): 1284-1290, 2000.

CLEGG, J.B.; WEATHERALL D.J. Thalassemia and malaria: new insights into na old problem. **Proc. Assoc. Am. Physicians**, 111: 278-282, 1999.

DACIE, J.V.; LEWIS, S.M. **Practical Haematology**. 6<sup>th</sup> ed. Churchill, London, 1985. p.516.

DAS, S.K.; TALUKDER, G. A review on the origin and spread of deleterious mutants of the beta-globin gene in Indian populations. **Homo**, 52(2): 93-109, 2001.

DASH, S. Hb A2 in subjects with Hb D. **Clin. Chem.**, 44: 2381-2382, 1998.

EL-KALLA, S.; MATHEWS, A.R. Hb D-Punjab in the United Arab Emirates. **Hemoglobin**, 21: 369-375, 1997.

FIORETTI, G. et al. DNA polymorphisms associated with Hb D-Los Angeles [ $\beta$ 121(GH4)Glu  $\rightarrow$  Gln] in Southern Italy. **Hemoglobin**, 17(1): 9-17, 1993.

FLINT, J. et al. The population genetics of the haemoglobinopathies. **Baillieres Clin. Haematol.** 11: 1-51, 1998.

FODOR, F.H.; ENG, C.M. Molecular exclusion of haemoglobin SD disease by prenatal diagnosis. **Prenat. Diagn.**, 19: 58-60, 1999.

FUCHAROEN, G. et al. Frequency distribution and haplotypic heterogeneity of  $\beta^E$ -globin gene among eight minority groups of Northeast Thailand. **Hum. Hered.**, 53: 18-22, 2002.

FUCHAROEN, S. et al. Clinical manifestation of  $\alpha$ -thalassemia/hemoglobin E disease. **J. Ped. Hemat. Oncol.** 22(6): 552-557, 2000.

FUCHAROEN, S. et al. Atypical hemoglobin H disease in a Thai patient resulting from a combination of alpha-thalassemia 1 and hemoglobin Constant Spring with hemoglobin J Bangkok heterozygosity. **Eur. J. Hematol.**, 66(5): 312-316, 2001.

GIORDANO, F.; SAVARINO, A.; PAGNI, C.A. Spinal meningioma during hydroxyurea therapy. A paradoxical case report. **Neurol. Sci.**, 23(3): 127-129, 2002.

GRIGNOLI, C.R.E. et al. Hb Rio Claro[ $\beta$ 34 (B16) Val<sup>1</sup>[Met]: a novel electrophoretically silent variant found in association with Hb Hasahron [ $\alpha$ 47 (CE5) Asp<sup>1</sup>[His] and  $\alpha$ -thalassemia-2 ( $-\alpha^{3.7}$ ). **Hemoglobin**, 23: 177-182, 1999.

HARJU, S.; MCQUEEN, K.J.; PETERSON, K.R. Chromatin structure and control of beta-like globin gene switching. **Exp. Biol. Med.**, 227(9): 683-700, 2002.

HATTORI, Y. Globin gene mutation is a model of genetic abnormalities. **Rinsho Byori**, 47(3): 233-251, 1999.

HEMPE, J.M.; CRAVER, R.D. Separation of hemoglobin variants with similar charge by capillary isoelectric focusing: value of isoelectric point for identification of common and uncommon hemoglobin variants. **Electrophoresis**, 21: 743-748, 2000.

HONIG, G.R.; ADAMS III, J.G. **Human Hemoglobin Genetics**. Wien: Springer Verlag, 1986. 452p.

HUISMAN, T.H.J. The beta thalassemia repository. **Hemoglobin**, 14(6): 661-675, 1990.

HUISMAN, T.H.J. The beta and delta thalassemia repository. **Hemoglobin**, 16(4): 237-258, 1992.

HUISMAN, T.H.J.; CARVER, M.F.H.; EFREMOV, G.D. **Globin Gene Server**. 1996. Disponível em :  
<http://globin.cse.psu.edu>. Acesso em 05 dez. 2002.

HUISMAN, T.H.J. Combinations of  $\beta$  chain abnormal hemoglobins with each other or with  $\beta$ -thalassemia determinants with known mutations: influence on phenotype. **Clin. Chem.**, 43: 1850-1856, 1997.

JARMAN, A.P. et al. Characterization of the major regulatory element upstream the human alpha-globin gene cluster. **Mol. Cell Biol.**, 11(9): 4679-4689, 1991.

KUTLAR, F. et al. Usefulness of HPLC methodology for the characterization of combinations of the common  $\beta$  chain variants Hb S, C and O-Arab, and the  $\alpha$  chain variant Hb G-Philadelphia. **Hemoglobin**, 17(1): 55-66, 1993.

LAWRENCE, C. et al. Molecular interactions between Hb  $\alpha$ -G-Philadelphia, Hb C and Hb S: Phenotypic implications for SC  $\alpha$ -G-Philadelphia disease. **Blood**, 90(7): 2819-2825, 1997.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COS, M.M. Proteínas globulares: estrutura e função da hemoglobina. In:\_\_\_ **Princípios de Bioquímica**. São Paulo: Sarvier, 1995. p. 127-152.

LEO, E. et al. Gangrene of the toes in a patient with chronic myelogenous leukemia after long-term hydroxyurea therapy. **Ann. Hematol.**, 81(8): 467-469, 2002.

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

LEWIN, B. Gene numbers: repetition and redundancy. In:\_\_\_**Genes VI**, Oxford: Oxford University Press, 1997. p. 703-731.

LUNG, H.Y. et al. In vivo silencing of the human gamma-globin gene in murine erythroid cells following retroviral transduction. **Blood Cells Mol. Dis.**, 26(6): 613-619, 2000.

MARENCO-ROWE, A.J. Rapid electrophoresis and quantitation of haemoglobin on cellulose acetate. **J. Clin. Path.**, 18: 790-792, 1965.

MIRANDA S.R.P. et al. Hb Lepore Baltimore ( $\delta$ 50Ser  $\beta$ 86Ala) identified by DNA analysis in a Brazilian family. **Acta Haematol.**, 91: 7-9, 1994.

MOLCHANOVA, T.P.; POBEDISMSKAYA, D.D.; HUISMAN, T.H. Two different mutations in codon 68 are observed in Hb G-Philadelphia heterozygotes. **Am. J. Hematol.**, 45(4): 345-346, 1994.

MOLTENI, S.; TRISCHKNECHT, H.; THORMANN, W. Application of dynamic capillary isoelectric focusing to the analysis of human hemoglobin variants. **Electrophoresis**, 15: 22-30, 1994.

MORLE, F. et al. Alpha-globin gene deletions associated with alpha A and alpha G Philadelphia in na Algerian family that include two Hb G homozygotes. **Hum. Genet.**, 65(3): 303-307, 1984.

MOSCOSO, H. et al. Enzyme immunoassay for the identification of hemoglobin variants. **Hemoglobin**, 14(4): 389-398, 1990.

MURAD, A.M.; PAIXÃO, M.C.; CARVALHO, M.G. Associação das hemoglobinas S-Lepore. **JBM**, 63(1): 164-167, 1992.

NAOUM, P.C. **Hemoglobinopatias no Estado de São Paulo: métodos de estudo, prevalência, distribuição geográfica e relações históricas e antropológicas. 1982.** Tese de Livre-Docência - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto.

NAOUM, P.C. **Eletroforese - Técnicas e Diagnósticos.** 1<sup>a</sup> edição. Santos Livraria Editora, 1990. 174 p.

NAOUM, P.C. **Eletroforese - Técnicas e Diagnósticos.** 2<sup>a</sup> edição. Santos Livraria Editora, 1999. 154 p.

NAOUM, P.C. et al. Hemoglobinopatias no Brasil. **Boletim**, 8(141): 180-188, 1986.

NORA, J.J.; FRASER, F.C. Aconselhamento Genético. In: \_\_\_\_**Genética Médica.** 3<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991. p.270-277.

OLIVIERI, N.F. et al. Iron overload and iron-chelating therapy in hemoglobin E- $\beta$  thalassemia. **J. Ped. Hemat. Oncol.**, 22(6): 593-597, 2000.

OU, C.; ROGNERUD, C.L. Rapid analysis of hemoglobin variants by cation exchange HPLC. **Clin. Chem.**,39(5): 820-824, 1993.

OZSOYLU, S. Homozygous hemoglobin D Punjab. **Acta Haemat.**, 53: 353-359, 1970.

PANTE-DE-SOUZA, G. et al. Origin of the hemoglobin S gene in a northern Brazilian population: the combined effects of slave trade and internal migrations. **Genet. Mol. Biol.**, 21(4): 177-183, 1998.

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

PARRA, F.C et al. Color and genomi ancestry in Brazilians. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, 100: 177-182, 2003.

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

PEREA, F. J. et al. Hb D-Los Angeles associated with Hb S or  $\beta$ -thalassemia in four mexican mestizo families. **Hemoglobin**, 23: 231-237, 1999.

PILLERS, D.M. et al. Hb Hope [ $\beta$ 136(H14)Gly  $\Pi$  Asp] and Hb E [ $\beta$ 26(B8) Glu  $\Pi$  Lys]: compound heterozygosity in a Thai Mien family. **Hemoglobin**, 16(1-2): 81-84, 1992.

PIPLANI, S. Hemoglobin E disorders in the North East India. **JAPI**, 48(11): 1082-1084, 2000.

POLITIS-TSEGOS, C. et al. Homozygous heamoglobin D Punjab. **J. Med. Genet.**, 12: 269-274, 1975.

PUNG-AMRITT, P. et al. Prevalence of Hb E from cord blood samples and after one year follow-up. **Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health**, 30: 97-99, 1999.

RAWN, J.D. **Biochemistry**. Burlington: Neil Patterson Publishers, ed., 1989. 1105 p.

REES, D.C.; CLEGG, J.B.; WEATHERALL, D.J. Is hemoglobin instability important in the interaction between hemoglobin E and  $\beta$  thalassemia? **Blood**, 92(6): 2141-2146, 1998.

REES, D.C. et al. Why are hemoglobin F levels increased in HbE/ $\beta$  Thalassemia? **Blood**, 94(9): 3199-3204, 1999.

RIBEIRO, M.L. et al. Hb Lepore-Baltimore ( $\delta$ 68Leu- $\beta$ 84Thr) and Hb Lepore – Washington-Boston ( $\delta$ 87Gln- $\beta$ IVS-II-8) in Central Portugal and Spanish Alta Extremadura. **Hum. Genet.**, 99: 669-673, 1997.

RIOU, J. et al. Cation-exchange HPLC evaluated for presumptive identification of hemoglobin variants. **Clin. Chem.**, 43: 34-39, 1997.

ROCHA, J.C. O apoio da genética à história dos brasileiros. **Pesquisa FAPESP**, 58: 32-35, 2000.

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

SAIKI, R.K. et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science**, 230: 487-491, 1988.

SALZANO, F.M. O apoio da genética à história dos brasileiros. **Pesquisa FAPESP**, 58: 32-35, 2000.

SALZANO, F.M., FREIRE-MAIA, N. **Populações brasileiras: aspectos demográficos, genéticos e antropológicos**. São Paulo, EDUSP, 1967. 177p.

SAMPAIO, Z.A.; NAOUM, P.C. A base genética das Hemoglobinas. **Boletim**, 10(150): 224-230, 1988.

SANGER, F., NICKLEN, S., COULSON, A.R. DNA sequencing with chain – terminating inhibitors. **Proc Natl. Acad. Sci.**, 74: 5463-5467, 1977.

SCHMUGGE, M. et al. Stroke in hemoglobin (SD) sickle cell disease with moyamoya: successful hydroxyurea treatment after cerebrovascular bypass surgery. **Blood**, 97(7): 2165-2167, 2001.

SCHNEE, J. et al. Hb D Los Angeles (D-Punjab) and Hb Presbyterian: analysis of the defect at the DNA level. **Hum. Genet.**, 84: 365-367, 1990.

SCHNEIDER, R.G. Differentiation of electrophoretically hemoglobins - such as S, D ou G and P or A<sub>2</sub>, C, E and O – by electrophoresis of the globin chains. **Clin. Chem.**, 20: 1111-1115, 1974.

SCHNEIDER, R.G. et al. Abnormal hemoglobins in a quarter million people. **Blood**, 48(5): 629-637, 1976.

SHIROHZU, H. et al. Repression of aberrant splicing in human beta-globin pre-mRNA with HbE mutation by antisense oligoribonucleotide or splicing factor SF2/ASF. **Int. J. Hematol.**, 72: 28-33, 2000.

SILVA JR., W.A.; ARAÚJO, J.T.; ZAGO, M.A. Hemoglobin J Rovigo ( $\alpha^{53}$  Ala $\Pi$ Asp) is not associate with an  $\alpha$ -globin gene deletion. **Rev. Brasil. Genet.**, 15(3): 667-673, 1992.

SILVESTRONI, E.; BIANCO, I. Screening for microcytemia in Italy: analysis of data collected in the past 30 years. **Am. J. Hum. Genet.**, 27: 198-212, 1975.

STEGER, H. et al Hemoglobin E and codon 17 nonsense: two  $\beta$ -globin gene mutation common in Southeast Asia detected by the use of ARMS. **Ann. Hematol.**, 67: 119-120, 1993.

THEIN, S. L. et al. Direct detection of haemoglobin E with synthetic oligonucleotides. **Lancet**, 11: 93, 1986.

VELLA, F. Acid agar gel electrophoresis of human hemoglobin. **Am. J. Clin. Path.**, 49(3): 440-442, 1968.

VELLA, F.; LEHMANN, H. Haemoglobin D Punjab (D Los Angeles). **J. Med. Genet.**, 11: 341-348, 1974.

VIPRAKASIT, V. et al. Complex interactions of  $\delta\beta$  hybrid haemoglobin (Hb Lepore-Hollandia) Hb E ( $\beta$  G  $\Pi$  A) and  $\alpha$ -thalassaemia in a Thai family. **Eur. J. Haematol.**, 58: 107-112, 2002.

WADA, Y. Mass spectrometry in the integrated strategy for the structural analysis of protein variants. **Biol. Mass Spectrometry**, 21: 617-624, 1992.

WAJCMAN, H. et al. Abnormal hemoglobins: laboratory methods. **Hemoglobin**, 25(2), 169-181, 2001.

WAYE, J.S.; CHUI, D.H. The alpha-globin gene *cluster*: genetics and disorders. **Clin. Invest. Med.**, 24(2): 103-109, 2001.

WEATHERALL, D.J. The thalasseмии. **Brit. Med. J.**, 314: 1675-1678, 1997.

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

WEATHERALL, F.J.; CLEGG, J.B. **The thalassemia syndromes**. Third edition. Blackwell scientific Publications. 1981. 875 p.

WENNING, M.R.S.C. et al. Hb Campinas [ $\alpha$ 26 (B7) Ala $\rightarrow$ Val]: a novel, electrophoretically silent, variant. **Hemoglobin**, 24: 143-148, 2000.

WHITE, J.M. et al. Synthesis of haemoglobin Lepore. **Nature New Biol.**, 235: 208-210, 1972.

WORTHINGTON, S.; LEHMANN, H. The first observation of Hb D Punjab  $\beta$ 0 thalassaemia in a English family with 22 cases of unsuspected b o thalassaemia minor among its members. **J. Med. Genet.**, 22: 377-381, 1985.

ZAGO, M.A. Hemoglobinopathies: recent advances and collaborative research. **Ciência e Cultura**, 39(9): 829-833, 1987.

ZAGO, M.A., COSTA, F.F. Hb D-Los Angeles in Brazil: simple heterozygotes and associations with  $\beta$ -thalassemia and with Hb S. **Hemoglobin**, 12: 399-403, 1988.

ZAGO, M.A. O apoio da genética à história dos brasileiros. **Pesquisa FAPESP**, 58: 32-35, 2000.

ZAMARO, P.J.A. **Análise quantitativa e molecular de hemoglobina fetal em doadores de sangue**. 2002. Dissertação (Mestrado em Genética) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto.

ZENG, Y. et al. Identification of Hb D-Punjab gene: application of DNA amplification in the study of abnormal hemoglobins. **Am. J. Hum. Genet.**, 44: 886-889, 1989.

Resumo

CHINELATO-FERNANDES, A.R. Caracterização molecular de mutantes de cadeias globínicas São José do Rio Preto, 2003. 236p. Tese (Doutorado em Genética) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Campus de São José do Rio Preto, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

Mais de 800 variantes de hemoglobina já foram descritas, a maioria delas resultantes de mudanças na seqüência de nucleotídeos, ocasionando substituições de aminoácidos na cadeia polipeptídica e promovendo a formação de moléculas de hemoglobina com características físico-químicas diferentes das hemoglobinas normais. No Brasil, as diversas origens étnicas e os diferentes graus de miscigenação permitiram a dispersão de genes anteriormente característicos dos povos negróides e caucasianos. Muitos mutantes de hemoglobinas ainda encontram-se parcialmente caracterizados, enquanto outros permanecem sem a correta identificação do defeito molecular. Foram analisadas no presente estudo, 220 amostras de sangue provenientes de diferentes regiões do país. As metodologias de estudo incluíram procedimentos eletroforéticos como as eletroforeses em acetato de celulose, pH alcalino e em gel de ágar, pH ácido; focalização isoeétrica e eletroforese de cadeias globínicas em acetato de celulose, pH alcalino, além da cromatografia líquida de alta pressão e testes citológicos aplicados a cada caso. A caracterização molecular foi realizada, após extração do DNA genômico, por amplificação, digestão enzimática, hibridação com sonda oligonucleotídeo alelo específica e sequenciamento. Com base nos resultados obtidos pelos diferentes procedimentos laboratoriais, os mutantes encontrados foram classificados considerando-se a cadeia globínica alterada. Assim, foram encontrados 43 mutantes de cadeia alfa, 73 mutantes de cadeia beta, 11 prováveis mutantes de cadeia delta e 2 de cadeia gama, além de 7 indivíduos com a fusão de cadeias que origina a Hb Lepore. Foram encontradas também 19 amostras com cadeias globínicas apresentando migração semelhante ao padrão normal. Em 18 indivíduos não foi possível a realização da eletroforese de cadeias globínicas e, em 10 amostras observou-se associação de hemoglobinas variantes. Com padrão eletroforético semelhante à Hb S ou C, e com perfil cromatográfico alterado, foram encontradas 38 amostras. Foram caracterizadas por biologia molecular, 50 amostras incluindo portadores e seus familiares, com Hb D - Los Angeles em heterozigose e em associação com outras hemoglobinas anormais; um portador de Hb E e 10 portadores de Hb Hasharon. A utilização das metodologias eletroforéticas e cromatográficas em conjunto forneceram subsídios para o correto diagnóstico das variantes estudadas e direcionaram as avaliações moleculares, em especial por definir qual a cadeia globínica alterada. As informações obtidas e a confirmação dos mutantes foram fundamentais para o aconselhamento genético dos portadores e familiares. Favoreceu a implantação, por parte dos clínicos responsáveis, de medidas terapêuticas aplicadas a cada caso, contribuindo para o conhecimento das hemoglobinas anormais na população brasileira.

Palavras-chave: Hemoglobinopatias, Variantes de hemoglobina, Diagnóstico Laboratorial.

Abstract

CHINELATO-FERNANDES, A.R. Molecular characterization of globin chain mutants. São José do Rio Preto, 2003. 236p. Tese (Doutorado em Genética) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Campus de São José do Rio Preto, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

Over 800 hemoglobin variants have already been described, most of them resulting from changes in the sequence of nucleotides, generating replacements of amino acids in the polypeptide chain and leading to the formation of hemoglobin molecules with physical-chemical characteristics different from normal hemoglobins. In Brazil, several ethnic origins and different miscegenation degrees have allowed the dispersion of genes previously characteristic of Negroid and Caucasian peoples. Many hemoglobin mutants are still partially characterized, whereas others remain without an accurate identification of the molecular defect. In this study, 220 blood samples from different regions of the country have been analyzed. The study methodologies have included electrophoretic procedures such as electrophoresis in cellulose acetate, alkaline pH and in agar gel, acid pH; isoelectric focusing and electrophoresis of the globin chains in cellulose acetate, alkaline pH, in addition to the high-pressure liquid chromatography and cytological tests applied to each case. The molecular characterization was performed after the extraction of the genomic DNA, by amplification, enzymatic digestion, hybridization with specific allele oligonucleotide probe and sequencing. Based on the results obtained by the different laboratorial procedures, the mutants found have been classified considering the altered globin chain. Therefore, 43 mutants in each alpha chain, 73 mutants of beta chain, 11 probable mutants of delta chain and 2 of gamma chain have been found, in addition to the 7 individuals with fusion of chains originating Hb Lepore. 19 samples with globin chain presenting migration similar to the normal standard have also been found. It has not been possible to perform electrophoresis of the globin chains in 18 individuals, and it has been observed an association of variant hemoglobins in 10 samples. 38 samples have been found with the electrophoretic standard similar to Hb S or C and with altered chromatographic profile. 50 samples, including carriers and their relatives, have been characterized by molecular biology, with Hb D – Los Angeles in heterozygosis and in association with other abnormal hemoglobins; an Hb E carrier and 10 Hb Hasharon carriers. The use of electrophoretic and chromatographic methodologies together has provided means for the accurate diagnosis of the variants studied and has directed the molecular evaluations, particularly for pointing out the altered globin chain. The information obtained and the confirmations of the mutants have been essential for the genetic counseling to the carriers and their relatives. It has favored the implementation of therapeutic measures applied to each case by the physicians in charge, thus contributing for the awareness of abnormal hemoglobins in the Brazilian population.

Keywords: Hemoglobinopathies, Hemoglobin variants, Laboratorial diagnosis.