

Carta ao Editor / Letter to Editor

## Metodologias laboratoriais para o diagnóstico de hemoglobinas variantes

### *The laboratory methodology for diagnosis of hemoglobin variants*

Ana R. Chinelato-Fernandes<sup>1</sup>

Claudia R. B. Domingos<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Bióloga, Doutora pelo Programa de Pós-graduação em Genética do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas - Ibilce - Unesp.  
<sup>2</sup>Profa. Dra. responsável pelo Laboratório de Hemoglobinopatias e Genética das Doenças Hematológicas (LHGDH) - Ibilce - Unesp.

#### Senhor Editor

O número de hemoglobinas variantes descritas na literatura tem aumentado significativamente. Até o momento, mais de novecentas já foram catalogadas no Hemoglobin Variant Data Base desenvolvido na World Wide Web.<sup>1</sup>

Os métodos de diagnóstico laboratorial utilizados atualmente para a identificação de hemoglobinas variantes sofreram modificações. Os detalhes nas metodologias estão descritas nos protocolos disponíveis em [www.lhgdh.ibilce.unesp.br](http://www.lhgdh.ibilce.unesp.br) e foram resultantes de dissertações e teses sobre o assunto.<sup>2,3</sup> Com a nova experiência estabeleceu-se o seguinte fluxo de análise:

Todas as amostras passam por uma triagem inicial para hemoglobinopatias, composta por três testes: resistência globular osmótica em cloreto de sódio a 0,36%, análise da morfologia eritrocitária a fresco e eletroforese em acetato de celulose em pH alcalino.<sup>2</sup> O teste de resistência globular osmótica é utilizado para detectar talassemia beta heterozigota, mas apresenta também positividade em alguns casos de hemoglobinas variantes. Na análise da morfologia eritrocitária são avaliados o tamanho, a forma e a coloração dos eritrócitos. Também não é um teste específico, pois células com microcitose e hipocromia são observadas nos portadores de talassemia beta heterozigota e de associações de hemoglobinopatias. É possível a visualização de células em forma de foice, indicativas de Hb S ou células em alvo, que indicam a presença de Hb C.<sup>2</sup>

A eletroforese em pH alcalino é utilizada para a qualificação e quantificação de hemoglobinas normais e anormais. As diferentes mobilidades eletroforéticas são originadas por alterações de carga elétrica, causadas por substituições de aminoácidos no polipeptídeo. As proteínas geradas por substituições com cargas semelhantes a outras variantes apresentarão migração similar neste pH, como, por exemplo, as

Hb A<sub>2</sub>, Hb C, Hb O e Hb E, e Hb S, Hb D e Hb G.<sup>3</sup> Mapas de perfil eletroforético com o traçado de migrações específicas de hemoglobinas normais e anormais devem ser consultados para auxiliar a identificação.<sup>2,3</sup>

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, auxiliando no entendimento dos processos fisiopatológicos associados ao distúrbio genético em questão.<sup>2</sup>

O segundo passo na investigação de hemoglobinas variantes é submeter as amostras à eletroforese em gel de ágar fosfato, pH 6,2, específica para diferenciar alguns tipos de hemoglobinas, como, por exemplo, Hb S da Hb D e a Hb C da Hb E, que, em pH alcalino, apresentam co-migração.

Após esses procedimentos e análise dos resultados obtidos, as amostras são submetidas a testes mais específicos na caracterização de hemoglobinas variantes.

A eletroforese de cadeias globínicas, pH alcalino, apresenta boa resolução para os mutantes de cadeia alfa e beta. Apresenta limitações, em relação às hemoglobinas D-Los Angeles e Hb Korle-Bu, que apresentam fração similar neste procedimento.<sup>2,3</sup>

A eletroforese de cadeias globínicas, pH ácido permite a separação das frações de globinas por suas afinidades diferenciadas em pH ácido. Apresenta boa visualização das globinas gama.

O HPLC possui maior acurácia do que os procedimentos eletroforéticos. O sistema automatizado é de fácil manuseio e os resultados são apresentados rapidamente. O equipamento Variant com o programa "β-Thalassemia Short" (Bio-Rad Laboratories) é utilizado para a quantificação das Hb A<sub>2</sub> e Hb F, além da identificação das Hb A, Hb S, Hb D e Hb C. O tempo de retenção das frações normais permite padronizar o tempo de eluição das variantes, sendo este um critério adicional para identificação. Entretanto, pequenas variações no tempo de eluição da coluna cromatográfica podem levar a hemoglobina variante a ser eluída em outra "janela". Além disso, algumas variantes não são eluídas em "janelas" próprias, como as Hb Lepore ou Hb E. Dessa forma, é necessária a averiguação dos dados por meio de procedimentos eletroforéticos.

Outras variantes, como a Hb Korle-Bu, apresentam comportamento eletroforético idêntico à Hb D, 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.<sup>2,3</sup>

A padronização dos resultados normais e das hemoglobinas variantes encontradas na população brasileira se faz necessária, bem como o estabelecimento dos padrões para cada laboratório. Além disso, devem ser utilizadas técnicas ainda mais sensíveis para elucidação da suspeita e a associação de várias delas, objetivando um diagnóstico preciso.<sup>1,2</sup> Definido o possível mutante, deve-se ajustar a escolha da metodologia de confirmação.

A PCR, aliada às endonucleases de restrição, constitui um importante instrumento de análise. Os RFLP são

definidos pela existência de fragmentos de restrição que diferem em tamanho após a ação dessas enzimas. Sua presença pode ser utilizada como um marcador genético ou para confirmação da mutação que leva à formação da hemoglobina variante.<sup>2</sup>

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.<sup>2</sup>

## Conclusões

Cada metodologia de diagnóstico apresenta limitações na identificação das hemoglobinas anormais, e a co-migração pode subestimar a frequência de algumas hemoglobinas variantes.<sup>8</sup> Portanto, a combinação de várias técnicas clássicas e moleculares parece ser necessária para a identificação acurada das hemoglobinas variantes.<sup>1,9</sup>

O estudo familiar também pode auxiliar no esclarecimento de heranças complexas, como a interação de Hb E, Hb Lepore e talassemia alfa<sup>10</sup> 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. A ocorrência de tais associações exige, portanto, que todos os recursos disponíveis, 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 se evitarem 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 e 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.<sup>11</sup>

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, como nos Estados

Unidos, 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.<sup>12</sup>

## Abstract

*Among the electrophoretical methodologies for hemoglobin examinations under different experimental conditions, isoelectrofocusing and high performance liquid chromatography are the most frequently used for the detection of hemoglobin variants. Moreover, molecular techniques are also developed in many laboratories. The correct laboratorial diagnosis of hemoglobin alterations is especially important for the interactive forms principally in Brazil, because of the many associations of hemoglobin alterations and variants with co-migration. The association of classical and molecular techniques is essential for accurate identification of hemoglobin variants.*

**Key words:** Hemoglobinopathy diagnosis; methodologies association; hemoglobinopathies.

**Palavras-chave:** Hemoglobinopatias; polimorfismo; variante.

## Agradecimentos

*Agradecemos à Dra. Ida Maria Maximina Fernandes pela correção do Abstract.*

## Referências Bibliográficas

1. Wajeman H et al. Abnormal hemoglobins: laboratory methods. *Hemoglobin* 2001;25(2):169-81.
2. Chinelato-Fernandes AR. Diferenciação molecular de mutantes de hemoglobinas humanas na população brasileira. 2003. 236f. Tese (Doutorado em Genética). Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto.
3. Leoneli GG. 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.
4. 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* 1978;5(5):971-82.
5. Wada Y. Mass spectrometry in the integrated strategy for the structural analysis of protein variants. *Biol Mass Spectrometry* 1992;21:617-24.
6. Ou C, Rognerud CL. Rapid analysis of hemoglobin variants by cation exchange HPLC. *Clin Chem* 1993;39(5):820-4.
7. Laboratório de Hemoglobinas e Genética das Doenças Hematológicas. Protocolos. Disponível em [www.lhgdh.ibilce.unesp.br](http://www.lhgdh.ibilce.unesp.br). Acesso em 22 de julho de 2005.
8. Moscoco H et al. Enzyme immunoassay for the identification of hemoglobin variants. *Hemoglobin* 1990;14(4):389-98.
9. Clarke GM, Higgins TN. Laboratory investigation of hemoglobinopathies and thalassemias: review and update. *Clin Chem* 2000; 46(8):1.284-90.

10. Viprakasit V et al. Complex interactions of  $\delta\beta$  hybrid haemoglobin (Hb Lepore-Hollandia) Hb E ( $\beta G \rightarrow A$ ) and  $\alpha$ -thalassaemia in a Thai family. *Eur J Haematol* 2002;58:107-12.
11. Nora JJ, Fraser FC. Aconselhamento Genético. In: \_\_\_\_ Genética Médica. 1991. 3ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p.270-7.
12. Athanasiou-Metaxa M et al. Co-inheritance of Hemoglobin D-Punjab and Hemoglobin S: Case Report. *J Ped Hemat Oncol* 2002; 24:421-2.

Avaliação: Editor e dois revisores externos.

Conflito de interesse: apoio técnico - Bio-Rad, Bio-Oxford

Recebido: 30/06/2005

Aceito após modificações: 15/12/2005

---

**Correspondência para:**

Ana Regina Chinelato-Fernandes  
 LHGDH - Ibilce - Unesp  
 Rua Cristóvão Colombo, 2265 - Jardim Nazareth  
 15054-000 - São José do Rio Preto - SP  
 E-mail: ar.chinelato@uol.com.br

## Hemoglobinas anormais em sangue de cordão umbilical

### *Abnormal hemoglobins in umbilical cord blood*

---

Lízia Maria F. R. Campos<sup>1</sup>

Francisca L. Dias<sup>2</sup>

Marcel Mendes<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Pós-graduanda, mestrado em Patologia Clínica, UFTM.

<sup>2</sup>Professora, Disciplina de Genética, UFTM.

<sup>3</sup>Professor, Disciplina de Hematologia, Faculdade de Biomedicina, Uniube.

Universidade de Uberaba (Uniube), Laboratório de Análises Clínicas e Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM)

#### Senhor Editor

As hemoglobinopatias são grupos heterogêneos de distúrbios herdados recessivamente que incluem as talassemias e as doenças falciformes. As mutações que as originam são específicas de algumas regiões e, em muitos casos, determinadas por distribuições étnicas e geográficas, funda-

mentando os programas de controle destas alterações e o aconselhamento genético.<sup>1,2</sup>

Doença falciforme é o termo genérico para a família das hemoglobinopatias caracterizadas pela presença da hemoglobina S (Hb S). O defeito genético constitui basicamente a substituição do ácido glutâmico pela valina na posição seis da cadeia beta da hemoglobina. Esta é uma das alterações genéticas mais comuns em todo o mundo, acometendo aproximadamente um em cada quatrocentos indivíduos da raça negra. No Brasil se caracteriza por significativa mistura racial onde o processo de colonização teve grande influência na dispersão dos genes anormais, principalmente talassemia e falcemias.<sup>2,3</sup> As formas clínicas mais importantes atualmente são os níveis de hemoglobina fetal (Hb F), a coexistência de outras hemoglobinopatias hereditárias (ex: talassemias) e, finalmente, os diferentes haplótipos para a Hb S.<sup>4,5</sup>

Os níveis de hemoglobina fetal correspondem a menos de 1% da hemoglobina total em indivíduos maiores de 1 ano de idade, porém há casos onde eles se encontram bem mais elevados devido a fatores hereditários. Esses indivíduos apresentam menor severidade da anemia falciforme, já que as moléculas de Hb F não participam do processo de polimerização que ocorre entre as moléculas de hemoglobina S desoxigenada (desoxi Hb S).<sup>4,6</sup>

A associação da doença falciforme com outras hemoglobinopatias hereditárias é relativamente freqüente e leva a uma diversidade de quadros clínicos que variam desde formas assintomáticas até as mais severas. Quando a hemoglobina S é desoxigenada, a substituição do ácido glutâmico pela valina na posição seis da cadeia beta resulta numa interação hidrofóbica com outras moléculas de hemoglobina, desencadeando uma agregação em grandes polímeros.<sup>7,8</sup>

A polimerização da hemoglobina S desoxigenada é o evento primário na patogênese molecular da doença falciforme, resultando na distorção da forma da hemácia e diminuição acentuada da sua capacidade de se deformar.<sup>9</sup> Os afoçamentos repetidos podem também levar a formação de inclusões com características morfológicas de pequenos corpúsculos de Heinz. Essas inclusões se ligam à membrana e são parcialmente responsáveis pela destruição prematura dessas hemácias.<sup>2</sup>

O diagnóstico laboratorial, além de sinais indiretos de hemólise caracterizados por hiperbilirrubinemia indireta e reticulocitose, é o teste de afoçamento positivo (utilizando como agente redutor o metabissulfito de sódio) ou o teste de solubilidade indicando a presença de Hb S, mas não fazem distinção entre anemia falciforme, traço falciforme e heterozigotos compostos como a S/b talassemia. É a eletroforese de hemoglobina que estabelece o diagnóstico.<sup>6</sup>

O fenômeno algico, às vezes de grande intensidade, se manifesta em geral por dor músculo-esquelética, torácica ou abdominal, podendo, todavia, se originar em qualquer tecido, sendo necessário estabelecer seu diagnóstico diferencial com outras causas de dor, ligadas ou não a hemoglobinopatia S.<sup>10,11</sup>

Infecções severas são a maior causa de mortalidade e morbidade nos pacientes com anemia falciforme. Os sítios