

## Identificação de Hb Korle-Bu por HPLC e biologia molecular

### *Hemoglobin Korle-Bu identification by HPLC and molecular biology*

Claudia R. Bonini Domingos<sup>1</sup>

Beatriz M.C. Paixão<sup>2</sup>

Paula J. A. Zamaro<sup>1</sup>

Ana Regina Chinelato<sup>1</sup>

Guilherme G. Leoneli<sup>1</sup>

Wilson A. Silva Júnior<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Unesp – Universidade Estadual Paulista – Departamento de Biologia – Laboratório de Hemoglobinas e Genética das Doenças Hematológicas – São José do Rio Preto-SP.

<sup>2</sup>USP – Fundação Hemocentro – Ribeirão Preto-SP.

#### **Sr. Editor:**

A diversidade genética das hemoglobinopatias no Brasil pode ser evidenciada pelos diferentes tipos de hemoglobinas (Hb) observadas na população. Cerca de 800 tipos de variantes já foram caracterizadas em todo o mundo.<sup>1</sup> No Brasil, as hemoglobinas variantes mais frequentes são as Hb S e Hb C, em virtude da contribuição dos afro-descendentes na formação da população. Em menor número, há evidência de várias hemoglobinas, como: Hb D-Los Angeles, Hb J Rovigo, Hb Stanleville II, Hb Hasharon, etc.<sup>2,3</sup>

A Hb Korle-Bu é caracterizada por uma mutação na cadeia beta da globina, no códon 73 onde ocorre a troca de um ácido aspártico por uma asparagina (Asp → Asn) (GAT → AAT). Indivíduos heterozigotos são normais, e os homozigotos podem apresentar discretas alterações na morfologia dos eritrócitos, porém com perfil hematológico assintomático.<sup>1</sup> Esta variante é originária da África e dados da literatura revelam sua prevalência também em afro-descendentes dos Estados Unidos, América do Sul, México e Costa Rica.<sup>4</sup> A mutação confere à proteína diminuição na afinidade ao oxigênio, apresentando efeito Bohr, cooperatividade e estabilidade normais. Pode também estar associada às Hb S e Hb C.<sup>1,4</sup>

Neste trabalho, objetivou-se a identificação das Hb A Korle-Bu em amostras de sangue com perfil de Hb AS por procedimentos de rotina diagnóstica que incluem HPLC e análise molecular, alertando para sua ocorrência.

A casuística constou de amostras de sangue de indivíduos dos Estados de São Paulo, Bahia e Rio de Janeiro, provenientes de programas de triagem neonatal e serviços

hospitalares, colhidas por punção venosa em tubos com EDTA, após consentimento informado, analisadas no período de junho de 2000 a dezembro de 2001. As amostras foram submetidas aos procedimentos de triagem que incluíram testes citológicos e a eletroforese em pH alcalino em acetato de celulose.<sup>2,5,6</sup> Do total de amostras analisadas, 264 apresentaram padrão de migração eletroforética na posição de Hb AS. Todas foram submetidas à análise por HPLC no Sistema automatizado Variant (Bio-Rad).<sup>7</sup> Nas análises por HPLC, sete (2,65%) amostras apresentaram perfil cromatográfico de Hb A-Korle-Bu, ressaltando que três eram do mesmo núcleo familiar. Por não apresentar um sítio de restrição que permitisse a análise da mutação por digestão enzimática, as amostras de DNA foram analisadas por PCR e seqüenciamento automático em Sistema ABI, conforme ilustrado na Figura 1.<sup>8,9</sup> Os *primers* utilizados para análise da região onde se localiza a mutação para a Hb Korle Bu possuem as seguintes seqüências: *Primer Forward*: 5'CTG GGC ATG TGG AGA CAG AG 3'e *Primer Reverse*: 5'CAC TGA TGC AAT CAT TCG TC 3'; Este par de *primers* refere-se à região do éxon 2 do gene da beta globina.

As condições de amplificação seguiram protocolos descritos previamente.<sup>9</sup> Após a amplificação e seqüenciamento foram confirmadas as presenças do mutante referente à Hb Korle-Bu.

A análise por HPLC pelo sistema Variant demonstrou que o pico correspondente à Hb Korle-Bu se encontra na janela de Hb D, com tempo de retenção de 3,9 e desvio da linha de base (Figura 2). Tendo em vista que o perfil inicialmente obtido nas análises eletroforéticas em pH alcalino sugeria a presença de Hb AS, a análise do perfil cromatográfico foi auxiliar na definição da suspeita para posterior confirmação pelos métodos moleculares. Como muitos laboratórios de rotina utilizam apenas a eletroforese em pH alcalino como procedimento de diagnóstico laboratorial, destaca-se por estes achados a necessidade de inclusão de testes adicionais aos de rotina para o esclarecimento dos perfis hemoglobínicos na população brasileira.

#### **Abstract**

*Routine laboratorial diagnostic procedures for hemoglobin variants can be incorrect when based only on electrophoretic procedures. In this study we evaluated 264 blood samples with hemoglobin AS profile and of these, seven had a phenotype confirmed as hemoglobin A-Korle-Bu. Associated methodologies such as HPLC and molecular analyses supply necessary assistance for diagnosis and adequate genetic counseling.*

**Key words:** Hemoglobinopathies; Hb Korle-Bu; rare hemoglobin, laboratorial diagnosis.

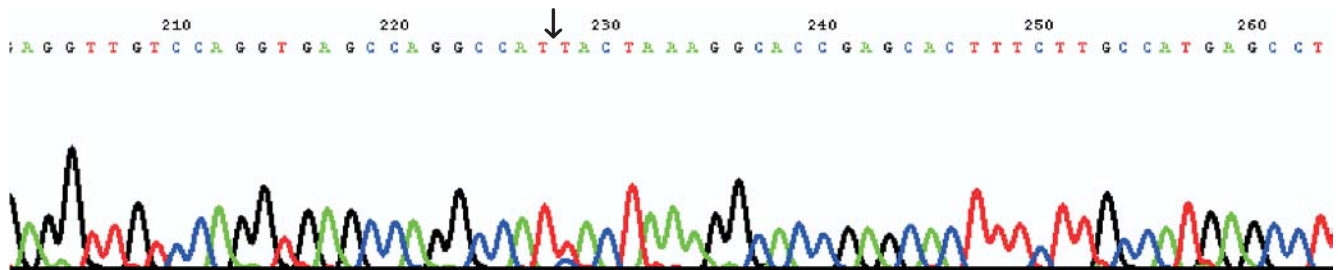


Figura 1. Reprodução da seqüência gerada para identificação do sítio de alteração

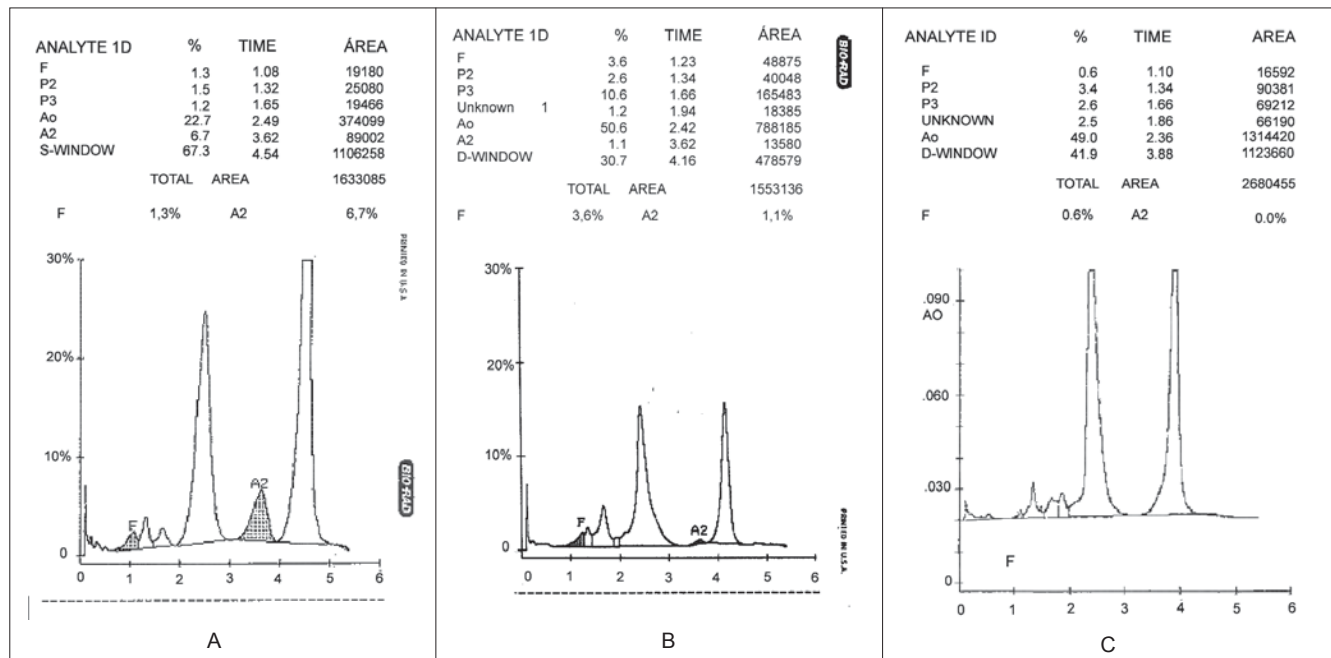


Figura 2: Amostras com Hb AS (A), Hb AD (B) e Hb A Korle-Bu (C) analisadas no sistema Variant de HPLC

## Referências Bibliográficas

- Hardison R, Riemer C, Chui DHK, et al. Electronic access to sequence alignments, experimental results and human mutations as an aid to studying globin gene regulation. *Genomics* 47: 429-437, 1998.
- Bonini-Domingos CR. Hemoglobinopatias no Brasil - Variabilidade genética e metodologia laboratorial. Tese apresentada para obtenção do grau de Doutor em Ciências, no Curso de pós-graduação em Ciências Biológicas da UNESP, campus de São José do Rio Preto, SP, Setembro de 1993.
- Zago MA. Hemoglobinopatias: prevalência e variabilidade. *Rev Paul Med* 1986;104(6):300-4.
- Honig GR; Adams III JG. Human hemoglobin genetics. Springer Verlag/wien, NY, 1986.
- Silvestroni E, Bianco I. Screening for microcytemia in Italy: analysis of data collected in the past 30 years. *Am J Hum Genetics* 1975;27:198.
- Marengo-Rowe AJ. Rapid electrophoresis and quantification of haemoglobin on cellulose acetate. *J Clin Path* 1965;18: 90-792.
- Bio Rad- protocols for HPLC.
- Leoneli GG. Hemoglobina D- Caracterização Eletroforética e Molecular. Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética, UNESP de São José do Rio Preto, SP, 2001.

- Madeira AMN, Gruber A. Site do Laboratório de Biologia Molecular da Faculdade de Medicina veterinária e Zootecnia da USP - Disponível em: 143.107.10.34/protocolos/prsequence.php3. Acesso em: 02 de março de 2005.

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

Recebido: 15/03/05  
 Aceito após modificações: 28/03/05

**Correspondência para:** Claudia Regina Bonini-Domingos  
 LHGDH, Ibilce, Unesp  
 Rua Cristóvão Colombo, 2265 - Jd. Nazareth  
 São José do Rio Preto-SP  
 Fax.: (17) 221-2390; Tel.: (17)221-2392  
 E-mail: claudiabonini@yahoo.com.br