

# Diagnóstico laboratorial de hemoglobinas semelhantes à HbS

Recebido em 12/06/01  
Aceito para publicação em 04/04/02

*Laboratorial diagnosis for hemoglobin like HbS*

Paula Juliana Antoniazio Zamaro<sup>1</sup>  
Andréia A. Canalli<sup>2</sup>  
Wilson Araujo da Silva Júnior<sup>3</sup>  
Claudia Regina Bonini Domingos<sup>4</sup>

## unitermos

Hemoglobina S  
Isoformas de hemoglobina  
Diagnóstico laboratorial

## resumo

A hemoglobina S (HbS) está presente na população brasileira com prevalência variável, dependente dos grupos raciais formadores de cada região. A migração eletroforética em pH alcalino apresenta similaridade com outras hemoglobinas, e estudos complementares para sua correta caracterização são necessários. No presente estudo objetivamos traçar um fluxograma com as metodologias disponíveis para a caracterização da hemoglobina S e das hemoglobinas que apresentam migração semelhante em pH alcalino. No período de janeiro a junho de 2000, analisamos amostras de sangue com suspeita de hemoglobina S encaminhadas ao Laboratório de Hemoglobinas da Unesp. Caracterizamos diferentes mutantes e formas interativas com hemoglobina S, por procedimentos eletroforéticos, em variados pH, análises citológicas e testes bioquímicos específicos. Os procedimentos de análise aplicados resultaram em orientação fornecida aos laboratórios de rotina sobre como proceder no diagnóstico laboratorial destas alterações de hemoglobina. Desta forma contribuímos para um melhor conhecimento sobre a variabilidade genética das hemoglobinas em nossa população, auxiliando no acompanhamento clínico e no aconselhamento genético das hemoglobinopatias com fisiopatologia relacionada à alteração.

## abstract

*The hemoglobin S is presented at Brazilian population with variable prevalence dependent of constitutive racial groups in each region. The electrophoretic migration on alkaline pH showed similarities with another hemoglobins. Complementary studies to the correct characterization becomes necessary. At the present study we aimed make a fluxogram with the available methodologies for the characterization of hemoglobin S and hemoglobins that present similar migration on alkaline pH. During the period of January to June, 2000, we had analysed blood samples with suspicious hemoglobin S sent to the Laboratory of Hemoglobins, Unesp. Were characterized different mutants and interactive forms with hemoglobin S by electrophoretic procedures on different pH, citologic anlysis and specific biochemical tests. The applied analytical procedures result in a guide for the routine laboratories with laboratories with laboratorial diagnostic procedure for these hemoglobin alterations. Thus, we contributed to a better knowledge about genetic variability at the hemoglobins in our population, helping on the clinical attendance and genetic conseling of hemoglobinopathies with relation to physiological alterations.*

## key words

Hemoglobin S  
Hemoglobinopathies  
Laboratorial diagnostic

1. Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Genética – Ibilce/Unesp – São José do Rio Preto-SP.
  2. Biomédica do Hemocentro – Ribeirão Preto-SP.
  3. Professor doutor do Laboratório de Clonagem e Biologia Molecular – Hemocentro – Ribeirão Preto-SP.
  4. Professora doutora do Laboratório de Genética das Doenças Hematológicas – Ibilce/Unesp – São José do Rio Preto-SP.
- Trabalho desenvolvido no Laboratório de Genética das Doenças Hematológicas – Ibilce/Unesp – Departamento de Biologia – São José do Rio Preto-SP.

## Introdução

A hemoglobina é uma proteína composta por quatro globinas, associadas a grupos heme, complexo formado por um átomo de ferro em uma estrutura porfírica. A porção protéica da hemoglobina consiste em dois pares de cadeias polipeptídicas. Nos adultos normais, há duas cadeias alfa e duas cadeias beta, formando a hemoglobina A, e duas cadeias alfa e duas delta para a hemoglobina A<sub>2</sub>. Durante o desenvolvimento fetal predomina a síntese de cadeias gama no lugar das cadeias beta, que, associadas às cadeias alfa, originam a hemoglobina fetal (HbF) (8).

Os genes da globina alfa estão arranjados no cromossomo 16, e os genes da betaglobina, no cromossomo 11. Cada um dos genes do *cluster* da globina tem sido seqüenciado, e sua estrutura, estabelecida, além de um número de importantes seqüências regulatórias bem definidas (3). Os elementos promotores agem em *cis* para o final 5' de cada um dos genes da globina, o TATA e o CCAAT *boxes*, e os motivos duplicados CACCC. Vários elementos acentuadores têm sido caracterizados. São seqüências distais, as quais aumentam os níveis de transcrição do gene. Há duas seqüências regulatórias: o LCR (região controladora do *locus*), no *cluster* do gene beta, marcado por sítios hipersensíveis à DNase, e o HS (sítio hipersensível), no *cluster* do gene alfa, similar ao LCR. Estas seqüências, e muitas regiões através do complexo do gene da globina, contêm sítios de ligação para fatores de transcrição específicos para a linhagem eritróide, GATA-1 e NF-E2 e para uma variedade de proteínas de ligação ao DNA ubiquitinosado. O modelo de controle da síntese de globinas mais favorecido sugere que a transcrição dos genes envolve a posição do LCR para cada gene individual, que, junto com uma variedade de fatores de transcrição de ação *trans* e com a RNA polimerase II, atua para formar um complexo transcricional na região promotora (14).

Um par de genes determina a estrutura da cadeia beta. Na anemia falciforme, a hemoglobina S é formada pela substituição de um aminoácido na cadeia beta, na posição número seis. O ácido glutâmico é substituído por uma valina. Ambos os genes responsáveis pela produção da cadeia beta codificam HbS. Neste caso, HbA não está presente devido à falta de alelo normal de cadeias. Os heterozigotos para HbS têm um único alelo alterado. O outro gene da cadeia beta codifica uma cadeia beta normal, resultando no traço falciforme. O gene  $\beta^S$ , por estar associado a algumas outras variantes estruturais, como a HbC, resultam em

indivíduos com HbSC. A herança com talassemia beta resulta em uma síndrome HbS- $\beta$ -talassemia (11, 14).

A maioria das hemoglobinas anormais resulta da substituição de um aminoácido por outro em uma das cadeias globínicas. Hemoglobinas C, D-Los Angeles, E e S são exemplo de tal defeito. Destas hemoglobinas anormais provém a base para a classificação das hemoglobinopatias – um grupo de anormalidades hereditárias no qual a produção de hemoglobinas normais é suprimida, em parte ou toda ela, e substituída pela produção de uma ou mais das muitas hemoglobinas variantes (1, 6, 8).

A hemoglobina S está presente na população brasileira com prevalências variáveis, dependentes dos grupos raciais formadores de cada região. A migração eletroforética em pH alcalino apresenta similaridade com outras hemoglobinas, e estudos complementares para sua correta caracterização são necessários (2).

A hemoglobina G (Philadelphia) é uma variante de cadeia alfa, com a mobilidade eletroforética semelhante à HbS em pH alcalino (11).

Métodos de avaliação para a detecção de hemoglobinas anormais incluem teste de solubilidade, eletroforese em pH alcalino e ácido, focalização isoelétrica, eletroforese de cadeias globínicas e cromatografia líquida de alta *performance* (HPLC). Estas técnicas apresentam vantagens e limitações para a separação de hemoglobinas (1, 4, 7). No presente estudo objetivamos traçar um fluxograma com as metodologias usuais para a caracterização das falcemias e das hemoglobinas que apresentam migração semelhante em pH alcalino. No período de janeiro a junho de 2000, analisamos amostras de sangue com suspeita de hemoglobina S encaminhadas ao Laboratório de Hemoglobinas da Unesp para caracterizar esta variante e as isoformas com migrações semelhantes.

## Material e métodos

As amostras de sangue utilizadas para a realização deste trabalho foram colhidas com EDTA a 5% como anticoagulante e enviadas ao Laboratório de Hemoglobinas na Unesp, em São José do Rio Preto (SP), após prévia autorização em termo de consentimento segundo orientação do Comitê de Ética em pesquisa da Unesp. As amostras foram submetidas aos procedimentos laboratoriais padronizados no Laboratório de Hemoglobinas, sendo:

- Testes de triagem:
  - resistência globular osmótica em NaCl a 0,36%, específica para triagem de talassemias (10);

- análise da morfologia eritrocitária (1);
- eletroforese em pH alcalino (5).
- Testes de confirmação:
  - eletroforese em pH ácido (12), utilizando o *kit* da Cia. Equipadora de Laboratórios Modernos (Celm);
  - isoeletrofocalização (6);
  - eletroforese de cadeias polipeptídicas (9);
  - cromatografia líquida de alta *performance* (HPLC) (10), com equipamento Variant Bio-Rad e *kit* betatalessemia heterozigota.
  - análises moleculares por PCR-RFLP utilizando os *primers* 5' → 3': GGC AGA GCC ATC TAT TGC TTA e (5' → 3'): ACC TTA GGG TTG CCC ATA AC, para HbS, C e D com as respectivas enzimas Ddel, BseRI e EcoRI.

## Resultados

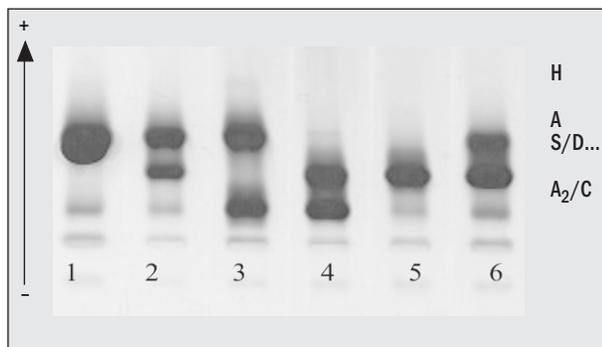
A co-migração de isoformas de hemoglobinas em eletroforese em pH alcalino levou-nos a pensar em uma pesquisa mais detalhada, tendo em vista que este procedimento é o mais rotineiramente utilizado em laboratórios.

O Laboratório de Hemoglobinas e o Laboratório de Genética das Doenças Hematológicas da Unesp recebem amostras de sangue para a caracterização de hemoglobinas anormais de diferentes localidades do país. Das amostras que foram submetidas aos procedimentos de triagem, 345 apresentaram migração eletroforética em pH alcalino na posição da HbS. Foram avaliadas por outras metodologias, onde caracterizamos diferentes isoformas de hemoglobinas, conforme pode ser visto na

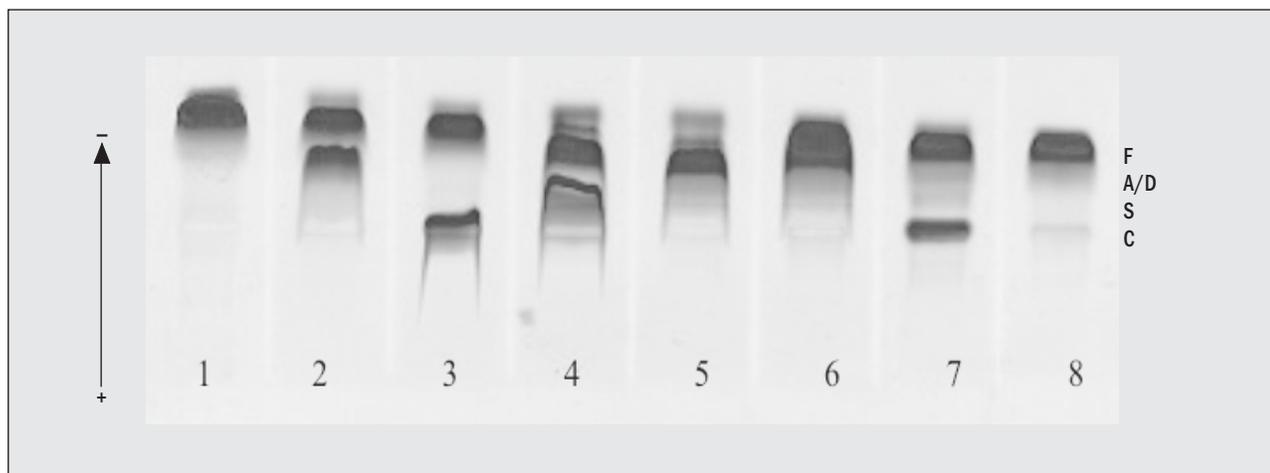
**Figura 1**, utilizando gel de agarose Celm. As amostras que apresentaram perfil semelhante à hemoglobina S em eletroforese alcalina foram submetidas a eletroforese em gel Celm, pH ácido (**Figura 2**), selecionando o que poderia ser HbS das hemoglobinas que não apresentavam o padrão esperado.

Pela metodologia de isoeletrofocalização observamos, nestas amostras, a presença da HbS e de outras variantes como a HbD e Hb Lepore, também caracterizadas em nosso estudo. Além destas variantes, identificamos um mutante de cadeia alfa do tipo G, por eletroforese de cadeias globínicas.

A cromatografia líquida de alta *performance* forneceu subsídios adicionais para a caracterização dos mutantes de hemoglobina. Os cromatogramas da **Figura 3** evidenciam os tempos de retenção das amostras com suspeita de HbAS, HbAD-Los Angeles, HbA Lepore, HbAG e interação HbS/ $\beta^+$ -talassemia, analisadas pelo *kit*



**Figura 1** – Eletroforese em gel em pH alcalino, com migração de amostras semelhantes à HbS. 1. HbAA; 2. HbAS; 3. HbAC; 4. HbSC; 5. HbSS; 6. HbS/beta mais talassemia



**Figura 2** – Eletroforese em gel Celm, em pH ácido, utilizado para caracterização de HbS. 1. HbAA; 2. HbAS; 3. HbAC; 4. HbSC; 5. HbSS; 6. HbAD; 7. HbS/beta mais talassemia; 8. HbA Lepore

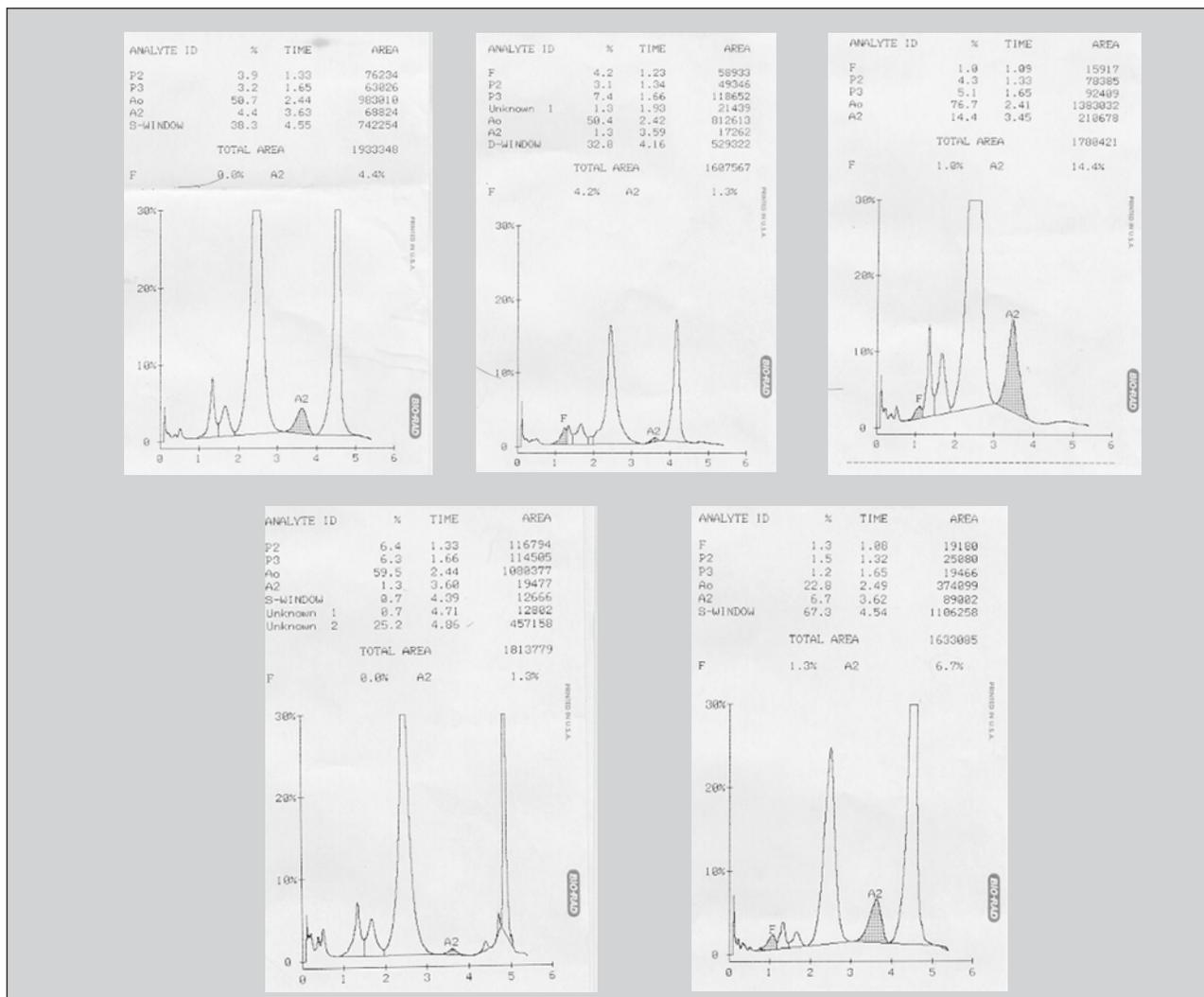


Figura 3 – Cromatogramas de portadores de hemoglobinas anormais com migração semelhante, em eletroforese em pH alcalino, utilizando equipamento Variant II Bio-Rad. 1. HbAS; 2. HbAD; 3. HbA Lepore; 4. HbAG; 5. HbS/beta mais talassemia

betatalassemia no equipamento Variant, da Bio-Rad, sendo que todas apresentaram padrão de migração similar em eletroforese alcalina.

O fluxograma da Figura 4 ilustra os procedimentos laboratoriais sugeridos para a caracterização de variantes de hemoglobinas com traçado eletroforético semelhante à HbS.

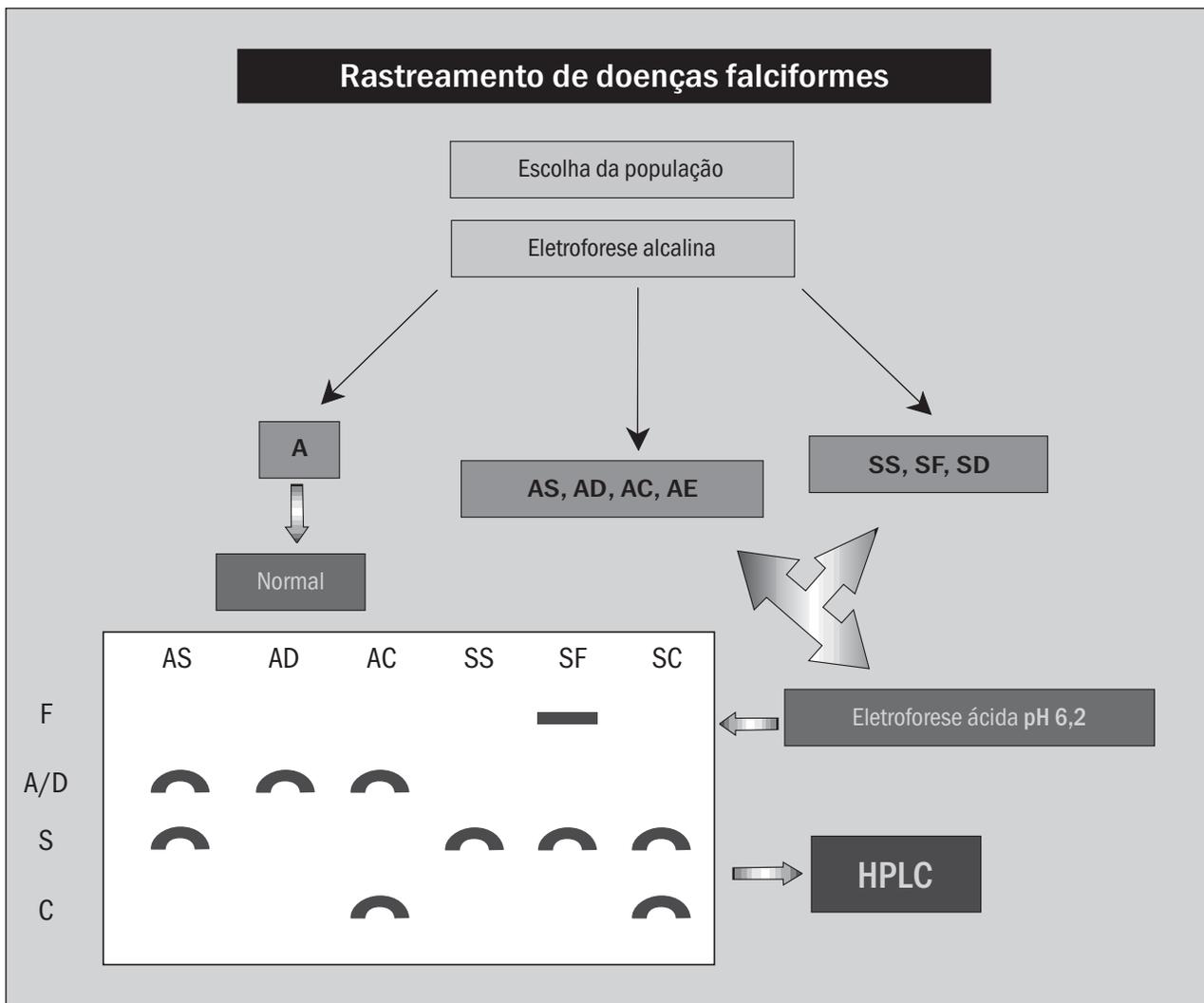
Algumas amostras foram submetidas à confirmação do diagnóstico por biologia molecular no Hemocentro de Ribeirão Preto. Realizamos a amplificação do DNA, por primers específicos para cada alteração, e, após análise em mapa de restrição, o produto foi digerido por enzimas que possibilitaram caracterizar os mutantes, fornecendo informações sobre seu genótipo. A Figura 5 ilustra um gel de agarose, com amostras amplificadas e digeridas para HbS, HbC e HbD, em diferentes combinações, evidenciadas por revelação com brometo de etídio.

## Discussão

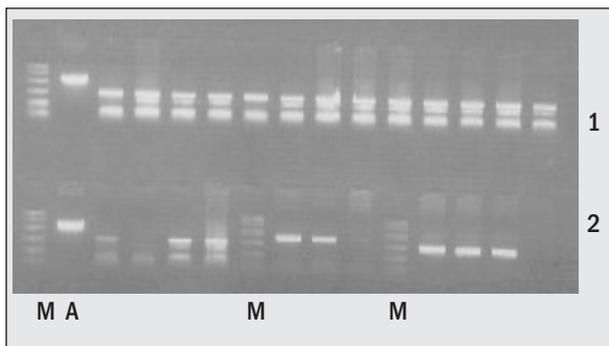
A prevalência do traço falciforme em nossa população é variável, de região para região, seguindo características da formação racial de nossa população (5).

A diversidade genética das hemoglobinas decorrente dos processos de migração nos faz repensar a utilização de metodologias para o diagnóstico de hemoglobinas anormais, muitas vezes feito através do fenótipo. Dados como origens racial e clínica, hematologia, transfusões e status de ferro auxiliam no diagnóstico.

A eletroforese em acetato de celulose, pH alcalino, amplamente difundida, é uma metodologia que deve ser utilizada como teste de rastreamento inicial para a detecção de hemoglobinas variantes. Metodologias complementares devem ser realizadas para a caracterização de hemoglobinas com migração semelhante.



**Figura 4** – Fluxograma de análises sugeridas para rastreamento de doença falciforme



**Figura 5** – Gel de agarose com amplificadores digeridos. Amostras de HbS na primeira linha; HbC, amostras de 8 a 10 na segunda linha; HbD, amostras de 12 a 14 na segunda linha. M: marcador; A: amplificado não-digerido

Nossos resultados mostraram que algumas isoformas de hemoglobina, migrando na posição de HbS em acetato de celulose ou agarose, em pH alcalino, puderam ser caracterizadas posteriormente como outras variantes. As

metodologias adicionais devem ser utilizadas na caracterização do genótipo destas variantes de hemoglobina, possibilitando um diagnóstico preciso da sua expressão.

Os procedimentos de análise aplicados em nosso estudo resultaram em um fluxograma que pode ser útil na orientação para os laboratórios de rotina, em como proceder no diagnóstico laboratorial destas alterações. Desta forma contribuímos para um melhor conhecimento sobre a variabilidade genética das hemoglobinas em nossa população, auxiliando desta maneira o acompanhamento clínico e o aconselhamento genético das hemoglobinopatias com fisiopatologia relacionada.

## Conclusões

Um programa para identificar hemoglobinas anormais deve utilizar metodologia adequada ao correto diagnósti-

co das diferentes isoformas para efetivo aconselhamento genético e tratamento destas desordens genéticas. A metodologia adequada inclui procedimentos eletroforéticos em diferentes pHs, isoeletrofocalização e HPLC. O

treinamento do pessoal capacitado para o diagnóstico laboratorial e o aconselhamento genético é de fundamental importância para o conhecimento das hemoglobinas anormais na população brasileira.

## Referências

1. Bonini-Domingos, C.R. Hemoglobinopatias no Brasil: variabilidade genética e metodologia laboratorial. São José do Rio Preto, 1993. *Tese de Doutorado em Ciências Biológicas*. Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista.
2. Guideline. The laboratory diagnosis of haemoglobinopathies. *British J. Haematol.*, 101: 783-92, 1998.
3. Honig, G.R. & Adams III, J.G. *Human hemoglobin genetics*. Wien: Springer, 1986.
4. Lorey, F. et al. Universal screening for hemoglobinopathies using high-performance liquid chromatography: clinical results of 2.2 million screens. *Eur. J. Hum. Genet.*, 2: 262-71, 1994.
5. Marengo-Rowe, A.J. Rapid electrophoresis and quantitation of haemoglobin on cellulose acetate. *J. Clin. Path.*, 18: 90-192, 1965.
6. Naoum, P.C. *Eletroforese, técnicas e diagnósticos*. São Paulo: Santos, 1998.
7. Papadea, C. & Cate, J.C. Identification and qualification of hemoglobins A, F, S, and C by automated chromatography. *Clin. Chem.*, 42: 57-63, 1996.
8. Schmidt, R.D. Laboratory diagnosis of hemoglobinopathies. *Jama*, 224: 1276-80, 1973.
9. Schneider, R.G. Differentiation of electrophoretically hemoglobins - suchas S, D, G and P or A2, C, E, and O- by electrophoresis of the globin chains. *Clin. Chem.*, 20: 1111-5, 1974.
10. 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.
11. Steinberg, M.H., Adams III, J.G. Laboratory diagnosis of sickling hemoglobinopathies. *Southern Medical Journal*, 71: 413-6, 1978.
12. Vella, F. Acid agar gel electrophoresis of human hemoglobins. *Am. J. Clin. Path.*, 49: 440, 1968.
13. Weatherall, D.J. *The thalassemia*. Churchill Livingstone, 1983.
14. Weatherall, D.J. & Clegg, J.B. Genetic disorders of hemoglobin. *Seminars in Hematology*, 36: 24-37, 1999.

### Endereço para correspondência

Paula Juliana Antoniazio Zamaro  
Rua Cristóvão Colombo 2265  
Jardim Nazareth  
CEP 15054-000 – São José do Rio Preto-SP  
e-mail: paula.z@lycos.com