

Carta ao editor / Letter to editor

## Identificação de variantes de hemoglobina em doadores de sangue

### *Identification of hemoglobin variants in blood donor*

Ana C. Bonini-Domingos<sup>1,2</sup>Lígia M. S. Viana-Baracioli<sup>3</sup>Claudia R. Bonini-Domingos<sup>2</sup><sup>1</sup>Curso de Farmácia e Bioquímica – Unip<sup>2</sup>Laboratório de Hemoglobinas e Genética das Doenças

Hematológicas –LHGDH; Ibilce/Unesp

<sup>3</sup>Hemocentro de São José do Rio Preto, SP

Trabalho realizado no Laboratório de Hemoglobinas e Genética das Doenças Hematológicas da Unesp em colaboração com o Hemocentro de São José do Rio Preto, SP.

#### Sr. Editor,

As hemoglobinopatias são patologias decorrentes da produção de uma molécula com estrutura anormal ou pela síntese insuficiente de globina normal. Constituem um grupo heterogêneo de distúrbios com padrão de herança recessivo, que incluem as talassemias e as variantes de hemoglobinas. Os tipos mais freqüentes de talassemia em nossa população são as alfa e beta, na forma heterozigótica. Entre as variantes de hemoglobinas, cerca de 800 são conhecidas, sendo mais comumente encontradas as Hb S e Hb C. São as doenças genéticas mais comuns e afetam a população brasileira com freqüências variáveis, refletindo a sua característica de formação étnica.<sup>1,2,3</sup> A Organização Mundial de Saúde estima que 5% da população mundial seja portadora de algum tipo de anemia hereditária.<sup>4</sup>

De acordo com a portaria RDC 343, de 13 de dezembro de 2002,<sup>5</sup> “todo sangue a ser coletado, processado e transfundido, deve apresentar boa qualidade, não podendo ser, portanto, veículo de propagação de patologias”. Esta portaria recomenda também que seja realizada a detecção de Hb S em doadores de sangue. O laboratório de Hemoglobinas e Genética das Doenças Hematológicas – LHGDH do Ibilce/Unesp, em parceria com o Hemocentro de São José do Rio Preto, SP, desenvolve estudos de hemoglobinas (Hb) anormais em doadores de sangue, visando a melhoria da qualidade do sangue a ser transfundido.

Com o objetivo de caracterizar as isoformas de hemoglobinas com migração eletroforética semelhante à Hb S em doadores de sangue, foram analisadas amostras de candidatos à doação, provenientes de São José do Rio Preto e região, colhidas por punção venosa, com EDTA como anticoagulante, de ambos os sexos e etnia variada, após consentimento informado, no Hemocentro de São José do Rio Preto-SP.

Inicialmente, foram triadas no Hemocentro as formas variantes de hemoglobinas por eletroforese pH alcalino,<sup>6</sup> e aquelas que apresentaram alguma alteração no traçado eletroforético foram enviadas para o LHGDH para estudo completo de hemoglobinopatias. Os procedimentos de análise incluíram testes de triagem tais como: Resistência osmótica em solução de NaCl a 0,36%,<sup>7</sup> para verificar a possível herança de talassemias; Morfologia eritrocitária,<sup>1</sup> que avalia a forma, o tamanho e o conteúdo de hemoglobinas dos eritrócitos, visando à identificação de achados laboratoriais característicos de hemoglobinas anormais; Eletroforese em acetato de celulose pH alcalino,<sup>6</sup> que identifica as hemoglobinas normais e grande parte das anormais.

As amostras que apresentaram suspeita de alterações nos testes de triagem foram submetidas aos testes confirmatórios que incluíram: Eletroforese pH ácido,<sup>8</sup> para diferenciação migratória de Hb S, Hb D, Hb C e Hb E; Cromatografia líquida de alta performance – HPLC, com o sistema automatizado VARIANT (Bio-Rad),<sup>9</sup> para identificação de Hb anormais e quantificação das diversas frações de Hb.

As amostras com perfis de Hb alterados nos testes de triagem e complementares foram submetidas à extração de DNA pelo método fenol-clorofórmio, com modificações.<sup>10</sup> Para confirmação dos mutantes de globina utilizou-se amplificação dos alelos por PCR,<sup>11</sup> análise por sonda oligonucleotídeo alelo específica (ASO) pelo Kit mDx (Bio-Rad Laboratories) e de fragmento de restrição (RFLP) após digestão com a enzima *Dde I* para Hb S, *Bse RI* para Hb C e *Taq I* para Hb Hasharon.<sup>12</sup>

Foram analisadas no Hemocentro, no período de janeiro de 2002 a abril de 2003, 16 mil amostras de sangue de doadores, por procedimentos, que incluíram hematócrito e eletroforese em pH alcalino. Destas, 397 amostras de sangue apresentaram alteração de hemoglobinas no perfil eletroforético em pH alcalino. O valor médio dos hematócritos foi de 40%. Do total de 397 amostras avaliadas no LHGDH, 71,53% correspondiam ao perfil eletroforético similar a Hb S; 22,41% ao perfil semelhante à Hb C e 6,04 % com perfis variados, incluindo variantes de migração mais rápida que a Hb A em eletroforese pH alcalino, destacando-se que todas estavam em heterozigose.

Dentre as amostras que apresentaram perfil inicial de Hb AS (heterozigoto para Hb S) cujo laudo geralmente é emitido por este achado laboratorial, destacou-se a freqüência de 58,45% de Hb AS; 36,26% de Hb AS associada à alfa talassemia e 0,35% de Hb AS com persistência hereditária de Hb F. Foram observadas ainda neste grupo de

“prováveis Hb AS”, 2,82% de Hb AD Los Angeles associada à alfa talassemia; 0,35% de Hb A Korle-Bu e 1,05% de Hb A Hasharon.

O quadro 1 detalha os diferentes mutantes de hemoglobinas e suas interações observados nos grupos de doadores com perfil eletroforético inicial sugestivo de heterozigose para hemoglobina variante, cujos dados estão ilustrados na figura 1.

A diversidade de variantes que puderam ser observadas em doadores de sangue com a implementação de novas metodologias de análise mostrou a presença de número significativo (40,83%) de interações e outras Hb “tipo S”. A definição daqueles mutantes de Hb com migração similar em eletroforese pH alcalino foi fundamentada em princípios cromatográficos (HPLC), onde a especificidade do sistema permitiu a identificação com segurança dos diferentes fenótipos observados.

Como as variantes estavam em heterozigose, evidenciou-se a necessidade de procedimentos detalhados na identificação destas alterações de hemoglobinas, tendo em vista que o perfil eletroforético inicial sugeria Hb AS. As interações com alfa talassemia somaram 42,1% do total de amostras e puderam ser confirmadas por eletroforese em pH neutro e pesquisa citológica específica.<sup>1</sup> A análise molecular dos mutantes foi realizada para a confirmação dos fenótipos “tipo S” encontrados.

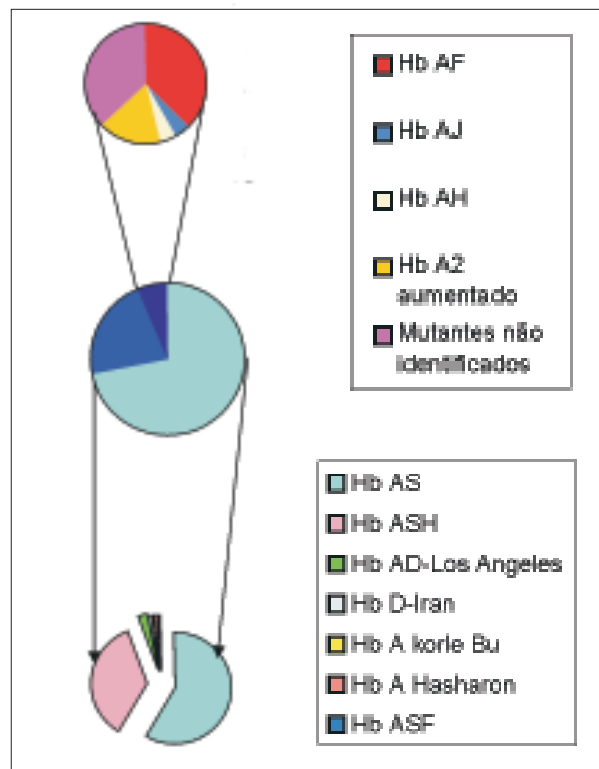
Além de destacar o enfoque social e clínico na abordagem do portador de hemoglobinas anormais, a detecção dos heterozigotos destas alterações genéticas é de grande importância para a saúde pública, pois representam fonte de novos heterozigotos e de possíveis homozigotos. As avaliações laboratoriais em doadores de sangue são fundamentais devido à necessidade de melhoria, a cada dia, da qualidade do sangue a ser transfundido. O aspecto educacional não deve ser desconsiderado, pois os portadores deverão ser orientados sobre a alteração genética e a importância da realização dos exames em seus familiares, visando melhor qualidade de vida.

**Abstract**

*Hemoglobinopathies are the most common genetic diseases and affect a great number of individuals in the world, with diverse clinical complications ranging from the almost unnoticeable to lethal consequences. In Brazil the occurrence of hemoglobinopathies is very frequent and influenced by the ethnical groups that are the basis of populations in different regions. The phenotype may be influenced by environmental and genetic factors*

**Quadro 1**  
**Detalhamento dos fenótipos de Hb observados em amostras de sangue de doadores do Hemocentro de São José do Rio Preto**

Total com perfil de Hb anormais	Triagem em pH alcalino	Outras metodologias	Interações com alfa talassemia	Interações com Hb Fetal	
397 amostras	Hb AS (284) [71,53%]	Hb AS (166) [58,45%]	(103) [36,26%]	(1) [0,35%]	
		Hb AD Los Angeles	(8) [2,82%]		
		Hb AD Iran	(2) [0,70%]		
		Hb A korle-Bu (1) [0,35%]			
		Hb A Hasharon (3) [1,05%]			
		Hb AC (89) [22,41%]	Hb AC (42) [47,19%]	(47) [52,80%]	
			Hb AF (4) [16,60%]	(5) [20,83%]	
			Hb AJ (1) [4,16%]		
			AH	(1) [4,16%]	
			A2 aumentado (1) [4,16%]	(1) [4,16%]	(2) [8,33%]
Outras hemoglobinas (24) [6,04%]	Mutantes não identificados (9) [37,5%]				



**Fig. 1** – Distribuição de variantes de hemoglobinas em heterozigose observadas em doadores de sangue após a combinação de metodologias de diagnóstico

and by migration. An understanding of these genetic diseases is important for the health and quality of life of the population. In this work we assessed the presence of Hb variants in blood donors from São José do Rio Preto and region, and we observed the occurrence of variants including Hb S and Hb C but in particular the so-called "S-Like" variants. Good determination of the forms of variant hemoglobins is very important to give better guidance to blood donors and their families, and to improve the quality of blood transfusion. Rev. bras. hematol. hemoter. 2004;26(1): 57-59.

**Key words:** Variant hemoglobins; S-Like hemoglobins; blood donors.

#### Referências Bibliográficas

- Bonini-Domingos, C. R. Prevalência de hemoglobinopatias no Brasil – Diversidade Genética e Metodologia Laboratorial 1993. 144f. (Tese de Doutorado em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, SP.
- Siqueira FAM, Bonini-Domingos CR. Diagnóstico de hemoglobinopatias em recém-nascidos do Hospital de Base de São José do Rio Preto, SP. Rev Bras Hemat Hemot 2000;21(1):63-64.
- http://globin.cse.psu.edu. Acesso em 08 de outubro de 2003.
- Clegg JB, Weatherall DJ. Thalassemia and malaria: new insights into an old problem. Proc Assoc Am Physicians 1999;111: 278-282.
- Brasil. Ministério da Saúde. RDC nº 343. Brasília, 2002.
- Marengo-Rowe AJ. Rapid electrophoresis and quantitation of haemoglobin on cellulose acetate. J Clin Path 1965;18:790-792.
- 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.
- Vella F. Acid agar gel electrophoresis of human hemoglobin. Am J Clin Path 1968;49(3):440-442.
- VARIANT™ hemoglobin system, Beta thalassemia short program; Instruction Manual BIO-RAD Laboratories. 2002
- Pena SDJ, Macedo AM, Gontijo NF, Medeiros AM, Ribeiro JCC. DNA bioprints: simple non-isotopic DNA fingerprints with biotinylated probes. Eletrophoresis 1991;v.12, p.14-52.
- Saiki RK, et al. Primer-directed enzymatic amplification DNA with a thermo stable DNA polymerase. Science 1988;230: 487-491.
- Bonini-Domingos CR, Mendiburu CF, Zamaro PJA. Treinamento em Biologia Molecular aplicada a triagem neonatal. Manual. São José do Rio Preto, SP, 2001.

#### Agradecimentos

Agradecemos o apoio da Bióloga Ana Cristina Carneiro Villanova Vidal e ao Laboratório de Imuno-hematologia do Hemocentro de São José do Rio Preto-SP, na seleção e envio de amostras; à Bio-Rad e Bio-Oxford pelo apoio técnico e suporte científico.

#### Avaliação:

Editor e dois revisores externos.

Conflito de interesse: não declarado

Recebido: 25/10/2003

Aceito após modificações: 10/03/2004

#### Correspondência para

Ana Carolina Bonini Domingos

LHGDH, Depto. de Biologia, Ibilce, UnespS. J. Rio Preto – SP

Rua: Cristóvão Colombo, 2265, Jardim Nazareth

Fone: (17) 221- 2392. Fax (17) 221- 2390

E-mail: ca\_lilith@yahoo.com.br

laboratorio\_hgdh@yahoo.com.br