

Artigo/Article

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

Electrophoretical, chromatographic and molecular valuations of Hb D Los Angeles in Brazil

Ana R. Chinelato-Fernandes¹
Guilherme G. Leoneli²
Patrícia O. Calderan³
Rute Blasi de Oliveira⁴
Wilson Araújo da Silva Jr.⁵
Claudia Augusta Hidalgo⁶
Claudia Regina Bonini-Domingos⁷

A variante de hemoglobina (Hb) D mais comum, Hb D Los Angeles ou D Punjab, é originada de uma transverso GAA→CAA 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 freqüente da população brasileira. Como as hemoglobinas D apresentam migração similar à hemoglobina S em pH alcalino, e com a hemoglobina 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. Rev. bras. hematol. hemoter. 2003;25(3):161-168.

Palavras-chave: Hemoglobina D Los Angeles; diagnóstico laboratorial; hemoglobinopatias.

¹Laboratório 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.

²Mestre em Genética pelo programa de Pós-Graduação do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas – Unesp, São José do Rio Preto-SP.

³Farmacêutica Bioquímica, responsável pelo Laboratório de Hematologia da Faculdade de Farmácia – Unic, Cuiabá-MT.

⁴Bioquímica do Laboratório de Hematologia do Centro de Hematologia e Hemoterapia de Santa Catarina – Fundação de Apoio ao Hemosc e Cepon – Fahece.

⁵Professor Doutor colaborador do Hemocentro de Ribeirão Preto-SP.

⁶Mestre em Matemática Aplicada pelo Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas – Unesp, São José do Rio Preto-SP.

⁷Professora 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.

Trabalho desenvolvido no Laboratório de Hemoglobinas e Genética das Doenças Hematológicas – Unesp

Correspondência para: Ana Regina Chinelato Fernandes
Ibilce – Unesp – Rua Cristóvão Colombo, 2265 – 15054-000 – São José do Rio Preto-SP
Fone: (17) 2212392 – E-mail: ar.chinelato@uol.com.br

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.^{1,2,3} 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 transversoão GAA→CAA 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.⁴ Essa hemoglobina é descrita tanto em heterozigose como em homozigose, além da combinação com Hb S ou talassemias alfa ou beta. Os indivíduos heterozigotos e homozigotos são assintomáticos, enquanto os que apresentam associação com Hb S ou talassemia beta podem desenvolver anemia hemolítica de discreta a moderada.⁵

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.^{2,3,4,6,7} Desse modo, além da eletroforese alcalina, são necessários testes confirmatórios para o correto diagnóstico, como eletroforese ácida, cromatografia líquida de alta pressão (HPLC), focalização isoeletrica (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 seqüenciamento.⁸

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, provenientes 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 a 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%,⁹ análise da morfologia eritrocitária a fresco¹⁰ e eletroforese alcalina em acetato de celulose utilizando-se tampão Tris-EDTA-borato em pH 8,5.¹¹ Como procedimento de confirmação, foram realizadas as eletroforeses em ágar com tampão fosfato pH 6,2,¹² de cadeias globínicas em acetato de celulose com tampão Tris-EDTA-borato, uréia e mercaptoetanol;¹³ focalização isoeletrica em agarose¹⁴ e cromatografia líquida de alta pressão (HPLC), com o equipamento Variant, da 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,¹⁵ e o éxon 3 da globina beta foi amplificado através da reação em cadeia da polimerase.¹⁶ A seqüência 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 por duas horas e trinta minutos 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-RFLP. A digestão do alelo normal gera produtos de 296pb e 268pb enquanto o alelo mutante apresenta uma única banda de 564pb. Os casos duvidosos foram submetidos a reação de seqüenciamento.¹⁷ Na presença de associação com outras variantes ou talassemias, foram realizados testes moleculares por PCR-ASO, com kits *mD_x* da Bio-Rad para confirmação.

Resultados

Os resultados obtidos nos procedimentos de triagem dos indivíduos investigados com suspeita de serem portadores de hemoglobina D Los Angeles estão relacionados na tabela 1. Observaram-se 80% dos indivíduos avaliados com resis-

Tabela 1
Resultados obtidos dos procedimentos de triagem dos indivíduos com suspeita de serem portadores de Hb D Los Angeles

Código	Resistência Osmótica	Morfologia Eritrocitária*	Eletroforese Alcalina
AR-010	Negativo	N/+	AS
AR-031	Negativo	N/+	AS
AR-033	Negativo	+	AS
AR-035	Negativo	N/+	AS
AR-037	Positivo	N/+	AS
AR-040	Negativo	N/+	AS
AR-060	Negativo	N/+	ASH
AR-121	Negativo	+	AS
AR-130	Negativo	N/+	ASH
AR-131	Positivo	+	SS
AR-134	--	--	AS
AR-135	Positivo	N/+	ASH
AR-136	Positivo	N/+	AFS
AR-137	Positivo	+	ASH
AR-156	Negativo	++	SS
AR-163	Negativo	N/+	AS
AR-171	Negativo	N/+	AS
AR-180	Negativo	+	AS
AR-196	Negativo	N/+	AS
AR-199	Positivo	+ / ++	SS
AR-200	Negativo	N/+	ASH
AR-201	Negativo	N/+	ASH
AR-208	Positivo	+ / ++	SSF
AR-209	Negativo	N/+	AS
AR-212	Negativo	N/+	AFSH
AR-213	Negativo	N/+	AS
AR-216	Negativo	N/+	AS
AR-217	Negativo	N/+	AS
AR-218	Negativo	N/+	AS
AR-219	Negativo	N/+	AS
AR-221	Negativo	+	ASH
AR-234	Positivo	++	AS
AR-236	Positivo	++	ASH
AR-237	Negativo	N/+	AS
AR-238	Negativo	+	ASH
AR-239	Negativo	+	ASH
AR-240	Negativo	+ / ++	ASF
G-005	Negativo	N/+	AS
G-006	Negativo	+	ASH
G-032	Negativo	N/+	AS
G-034	Negativo	N/+	AS
G-035	Negativo	+ / ++	AS
G-036	Negativo	N/+	AS
G-103	Negativo	+	AS
G-104	Negativo	+	ASF
G-107	Negativo	--	SS
G-108	--	--	SS

* -- Não foi possível a realização do teste. Células normais (N), com alterações discretas (+), alterações moderadas (++) , alterações acentuadas (+++) e intermediárias (N/+), (+/++), (++/+++).

tência osmótica em NaCl 0,36% negativa. 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.

Na tabela 2 estão apresentados os resultados obtidos nas eletroforeses alcalina, ácida e de cadeias globínicas em pH alcalino. 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 às 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 3 encontram-se os dados da análise por HPLC com o kit de diagnóstico para talas-

semia beta heterozigota (BTS) e equipamento Variant da Bio-Rad. Esse sistema identifica as Hb A2 e F como padrões quantitativos e permite a determinação das hemoglobinas variantes mais co-

Tabela 2
Resultados das eletroforeses alcalina, ácida e de cadeias globínicas dos indivíduos estudados

Código	Eletroforese Alcalina	Eletroforese Acidade	Eletroforese Cadeias Globínicas
AR-010	AS	AA	Beta
AR-031	AS	AA	Beta
AR-033	AS	AA	Beta
AR-035	AS	AA	Beta
AR-037	AS	AA	Beta
AR-040	AS	AA	Beta
AR-060	ASH	AA	Beta
AR-121	AS	AA	Beta
AR-130	ASH	AA	Beta
AR-131	SS	AA	Beta
AR-134	AS	AA	Beta
AR-135	ASH	AA	Beta
AR-136	AdimFS	AF	Beta
AR-137	ASH	AA	Beta
AR-156	SS	AA	Beta
AR-163	AS	AA	Beta
AR-171	AS	AA	Beta
AR-180	AS	AA	Beta
AR-196	AS	AA	Beta
AR-199	SS	AA	Beta
AR-200	ASH	AA	Beta
AR-201	ASH	AA	Beta
AR-208	SSF	AS	Beta
AR-209	AS	AA	Beta
AR-212	AFSH	AA	Beta
AR-213	AS	AA	Beta
AR-216	AS	AA	Beta
AR-217	AS	AA	Beta
AR-218	AS	AA	Beta
AR-219	AS	AA	Beta
AR-221	ASH	AA	Beta
AR-234	AS	AA	Beta
AR-236	ASH	AA	Beta
AR-237	AS	AA	Beta
AR-238	ASH	AA	Beta
AR-239	ASH	AA	Beta
AR-240	ASF	AF	Beta
G-005	AS	AF	Beta
G-006	ASH	AF	Beta
G-032	AS	AA	Beta
G-034	AS	AA	Beta
G-035	AS	AA	Beta
G-036	AS	AA	Beta
G-103	AS	AA	Beta
G-104	ASF	AF	Beta
G-107	SS	AF	--
G-108	SS	AS	--

muns, 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. Algumas amostras apresentaram pequenas frações de hemoglobinas reconhecidas 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 pelo HPLC. Os valores médios de Hb A0 estão próximos de 50%. Huisman¹⁸ encontrou quantidades elevadas de Hb A2 em indivíduos portadores de hemoglobinas do tipo D. Em nossos achados, a maior parte das amostras apresentou valores abaixo dos considerados normais, fato também mencionado por Dash.¹⁹ Alguns indivíduos, entretanto, apresentaram valores mais elevados, com destaque para a amostra AR-156. Os valores da Hb A2 e Hb D dessa amostra tomados juntos, associados a 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

Tabela 3
Tempos de retenção e porcentagem das frações de hemoglobinas nos indivíduos amostrados pelo HPLC

Cod.	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					6,70	1,30	3,70	1,70	74,40	2,40	2,40	3,64			13,10	4,18						
AR-031	2,80	2,10	0,70	1,10	3,90	1,30	3,40	1,70	50,00	2,60	2,20	3,64			36,70	4,28						
AR-033					4,20	1,30	4,50	1,70	55,20	2,40	1,00	3,67			35,30	4,17						
AR-035			0,80	1,10	3,20	1,30	4,40	1,70	54,90	2,40	1,10	3,68			35,70	4,18						
AR-037	0,80	1,00	0,80	1,10	7,10	1,30	12,00	1,70	37,50	2,50					40,20	4,32			3,80	2,90		
AR-040					3,60	1,30	3,30	1,70	55,30	2,40	1,00	3,67			37,10	4,17						
AR-060	2,30	2,10	1,10	1,10	3,50	1,30	6,30	1,70	49,6	2,50	1,50	3,64			36,00	4,20						
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	12,00	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	1,43	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						
Média	1,60		4,77		3,80		3,70		46,90		2,62		50,10		35,40		1,50		1,41		1,70	
DP	0,90		12,10		1,00		2,20		16,67		2,10		21,50		14,40		0,50		1,41		0,80	
Min		0,90		0,90		1,30		1,60		2,00		3,49		4,34		4,10		1,93		1,10		1,40
Máx		2,70		1,20		1,40		1,80		2,70		3,80		4,58		4,32		5,28		2,90		2,90

de PCR e análise dos fragmentos após digestão com a enzima EcoRI. Todas as amostras testadas apresentaram três fragmentos: dois 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.

O seqüenciamento foi realizado em dez das amostras 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; 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 subcontinente indiano. Estima-se que 3% da população de Punjab, na Índia, seja portadora heterozigota dessa variante.^{20,21} Na América Latina, essa hemoglobina foi descrita no Brasil, Argentina, Cuba, Guadalupe, Jamaica, Venezuela e México.⁴ Em nosso país, a Hb D Los Angeles é a terceira variante mais comum, após as Hb S e Hb C.¹⁰

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. Atra-

vés 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 e Hb G, 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.^{2,22} 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.²³ Entretanto, o equipamento foi padronizado para a população norte-americana; desse modo, torna-se necessária a padronização dos resultados normais e das hemoglobinas variantes para a população brasileira, além do estabelecimento dos padrões para cada laboratório. Para a Hb A2, a grande maioria das amostras analisadas apresentou valores abaixo da normalidade. Entretanto existem dados discordantes na literatura, que talvez possam ser explicados pelo uso de colunas ou sistemas de eluição diferentes.¹⁸ 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 a 95%.²² Os perfis eletroforéticos auxiliaram a elucidação destes casos, destacando-se a importância da utilização de metodologias clássicas aliadas a 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 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 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 seqüenciamento.

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.^{4,22,24} Os indivíduos heterozigotos são assintomáticos; em homozigose podem apresentar diminuição da fragilidade osmótica, células em alvo e níveis de hemoglobina A2 normais, mas é uma situação rara.

A co-herança de Hb D e talassemia beta é pouco descrita na literatura mundial.²² Os portadores de Hb D e talassemia beta apresentam anemia hemolítica de leve a moderada.^{4,6,22} Os indivíduos portadores da associação entre Hb S e D, chamada doença de Hb S/D, podem apresentar anemia hemolítica de leve a severa e clínica similar aos pacientes com anemia falciforme.^{4,6} 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.^{7,22}

Conclusões

Cada metodologia utilizada para a identificação das variantes de hemoglobinas apresenta limitações. Desse modo, faz-se necessária a utilização de técnicas clássicas associadas a estudos moleculares para a identificação acurada dessas hemoglobinas anormais. 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 A2 diminuída na maioria dos casos.

Abstract

The most common Hb D variant, the Hb D-Los Angeles, also known as Hb D-Punjab, originates through a GAA→CAA change at the 121 codon of the β globin gene; this mutation results in the replacement of glutamic acid for glutamine in the protein. It is the third most common hemoglobin variant in the Brazilian population. This variant has electrophoretic migration in alkaline pHs similar to Hb S and identical migration to hemoglobin A in acidic pHs. Thus, several techniques are necessary for its correct diagnosis. The purpose of this work 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 the Brazilian population with Hb D Los Angeles were studied. Multiple electrophoresis in several experimental conditions were carried out, in addition to high performance liquid chromatography

(HPLC) and molecular analysis to confirm this mutation. Four compound heterozygotes were observed: 42 individuals heterozygous Hb AD Los Angeles, two with Hb S/D Los Angeles disease, two individuals with Hb D Los Angeles and beta-thalassemia and one 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 varying degrees of clinical manifestations. The results presented emphasize the significance of the association of different laboratorial techniques for D Los Angeles diagnosis, and help to elucidate rare combinations. Rev. bras. hematol. hemoter. 2003;25(3):161-168.

Key words: Hemoglobin D Los Angeles; laboratorial diagnosis; hemoglobinopathies.

Referências Bibliográficas

- Vella F, Lehmann H. Haemoglobin D Punjab (D Los Angeles). Journal of Medical Genetics 1974;11:341-348.
- Politis-Tsegos C et al. Homozygous haemoglobin D Punjab. Journal of Medical Genetics 1975;12:269-274.
- El-Kalla S, Mathews AR. Hb D Punjab in the United Arab Emirates. Hemoglobin 1997;21:369-375.
- Perea FJ et al. Hb D Los Angeles associated with Hb S or β -thalassemia in four Mexican mestizo families. Hemoglobin 1999;23:231-237.
- Leoneli GG. 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.
- Fodor FH, Eng CM. Molecular exclusion of haemoglobin S D disease by prenatal diagnosis. Prenatal Diagnosis 1999;19:58-60.
- Worthington S, Lehmann H. The first observation of Hb D Punjab β 0 thalassaemia in a English family with 22 cases of unsuspected β 0 thalassaemia minor among its members. Journal of Medical Genetics 1985;22:377-381.
- Schnee J et al. Hb D Los Angeles (D Punjab) and Hb Presbyterian: analysis of the defect at the DNA level. Human Genetics 1990;84:365-367.
- 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.
- Bonini-Domingos CR. Prevenção das hemoglobinopatias no Brasil – Diversidade Genética e Metodologia Laboratorial. 1993. 144f. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Biociências, Letras e Ciência Exatas, Univ. Estadual Paulista – Unesp, São José do Rio Preto-SP.
- Marengo-Rowe AJ. Rapid electrophoresis and quantification of haemoglobin on cellulose acetate. J Clin Path 1965;18:790-792.
- Vella F. Acid agar gel electrophoresis of human hemoglobin. Am J Clin Path 1968;49(3):440-442.
- Schneider RG. Differentiation of electrophoretically hemoglobins – such as S, D ou G and P or A₂, C, E and O – by electrophoresis of the globin chains. Clin Chem 1974;20:1.111-1.115.
- Naoum PC. Eletroforese – Técnicas e Diagnósticos. 2ª edição. Santos Livraria Editora, 1999. 154 p.
- Pena SDJ et al. DNA bioprints: simple non-isotopic DNA fingerprints with biotinnylated probes. Electrophoresis 1991;121:146-152.
- Saiki RK et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science 1988;230:487-491.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain – terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci 1977; 74:5.463-5.467.
- Huisman THJ. Combinations of β chain abnormal hemoglobins with each other or with β -thalassemia determinants with known mutations: influence on phenotype. Clinical Chemistry 1997;43:1.850-1.856.
- Dash S. Hb A2 in subjects with Hb D. Clinical Chemistry 1998;44:2.381-2.382.
- 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: 886-889.
- Fioretti G et al. DNA polymorphisms associated with Hb D Los Angeles [b 121 (GH4)GLU→GLN] in Southern Italy. Hemoglobin 1993;17:9-17.
- Ahmed M et al. The β -globin genotype E121Q/W15X (cd121GAA→CAA/cd15TGG→TGA) underlines HbD/ β -(0) thalassaemia marked by domination of haemoglobin D. Ann Hematol 2001;80:629-633.
- Riou J et al. Cation-exchange HPLC evaluated for presumptive identification of hemoglobin variants. Clinical Chemistry 1997;43:34-39.
- Ozsoylu S. Homozygous hemoglobin D Punjab. Acta Haemat 1970;43:353-359.

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

Recebido: 08/01/2003
Aceito após modificações: 28/05/2003