



Hemoglobinas variantes com mobilidade eletroforética semelhante à da Hemoglobina S

Armandina Miranda¹, Filomena Seuanes¹, Sandra Copeto¹, Pedro Loureiro², Alcina Costa¹, Sandra Costa¹, Maria Teresa Seixas¹, João Gonçalves^{2,3}, Paula Faustino⁴

¹Unidade Laboratorial de Referência, Departamento de Promoção da Saúde e Prevenção de Doenças Não Transmissíveis, Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (INSA), Lisboa

²Unidade de Genética Molecular, Departamento de Genética Humana, INSA, Lisboa;

³Centro de Toxicogenómica e Saúde Humana (Toxomics), Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa;

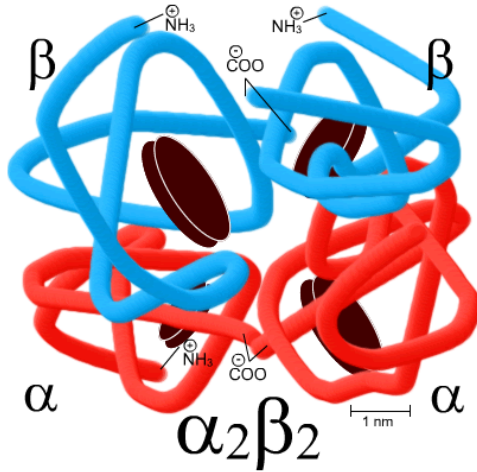
⁴Unidade de Investigação e Desenvolvimento, Departamento de Genética Humana, INSA, Lisboa

E-mail: armandina.miranda@insa.min-saude.pt

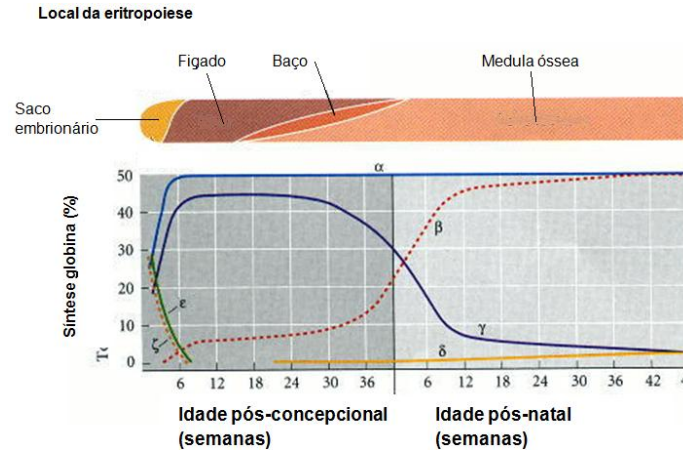
**2º Congresso de Controlo da Qualidade Laboratorial para Países de Língua Portuguesa -
12 a 14 de Outubro de 2017, Porto**

Hemoglobinas variantes com mobilidade eletroforética semelhante à da Hemoglobina S

Introdução



Estrutura da molécula da hemoglobina



Período Embrionário	Período Fetal	Período Adulto
Hb Gower 1 ($\zeta_2\varepsilon_2$)		HbA ($\alpha_2\beta_2$)
Hb Gower 2 ($\alpha_2\varepsilon_2$)	HbF ($\alpha_2\gamma_2$)	HbA ₂ ($\alpha_2\delta_2$)
Hb Portland ($\zeta_2\gamma_2$)		

As hemoglobinopatias são doenças monogénicas hereditárias, de transmissão autossómica recessiva, resultantes de mutações nos genes codificantes para as cadeias de globina da hemoglobina (Hb), ou nas suas regiões regulatórias.

Encontram-se entre as doenças hereditárias mais comuns e constituem um dos principais problemas de saúde a nível mundial.

Hemoglobinas variantes com mobilidade eletroforética semelhante à da Hemoglobina S

Hemoglobinopatias

❖ Talassémias

redução ou ausência de síntese das cadeias de globina

❖ Alterações estruturais

As variantes das hemoglobinas são causadas por defeitos estruturais resultantes de alterações na sequência de aminoácidos nas cadeias de globina:

silenciosas

associadas a patologia

H b S é a mais frequente e associada a patologia

Hemoglobinas variantes com mobilidade eletroforética semelhante à da Hemoglobina S

Hb S

Mutação GAG > GTG , no codão 6 do gene β -globina



Substituição de um ac.glutâmico > valina , 6º aminoácido da cadeia β -globínica.

Fisiopatologia:

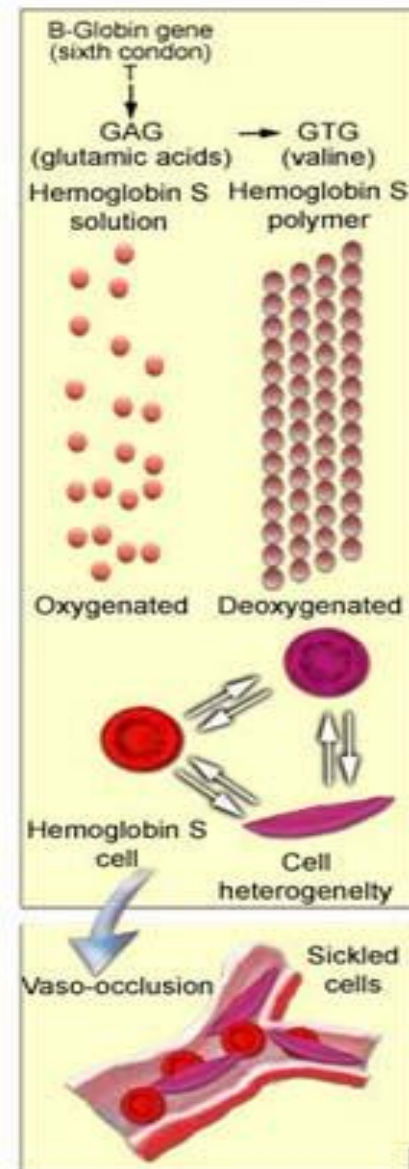
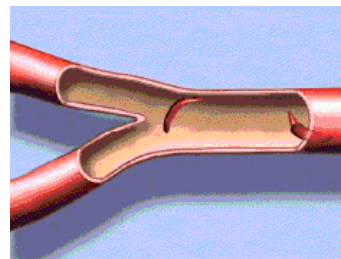
polimerização da HbS, em condições de desoxigenação.



Distorção do GV , ↓ flexibilidade, ↑ adesão paredes vasos sanguíneos



Vaso-oclusão
hipoxia tecidular
Lesão multiorgânica



Hemoglobinas variantes com mobilidade eletroforética semelhante à da Hemoglobina S

Introdução

- ✓ As hemoglobinopatias são as únicas, entre todas as doenças genéticas, em que a detecção de portadores é possível por testes hematológicos e bioquímicos.
- ✓ A **identificação** é frequentemente **presuntiva**: tempos de retenção e padrões de migração (baseada no mínimo em 2 metodologias com princípios de separação diferentes).

Os procedimentos analíticos mais comumente utilizados devem ter capacidade de detetar as variantes de hemoglobina clinicamente mais significativas: Hb S, Hb C, Hb D^{Punjab}, Hb Lepore, Hb E e Hb O^{Arab}.

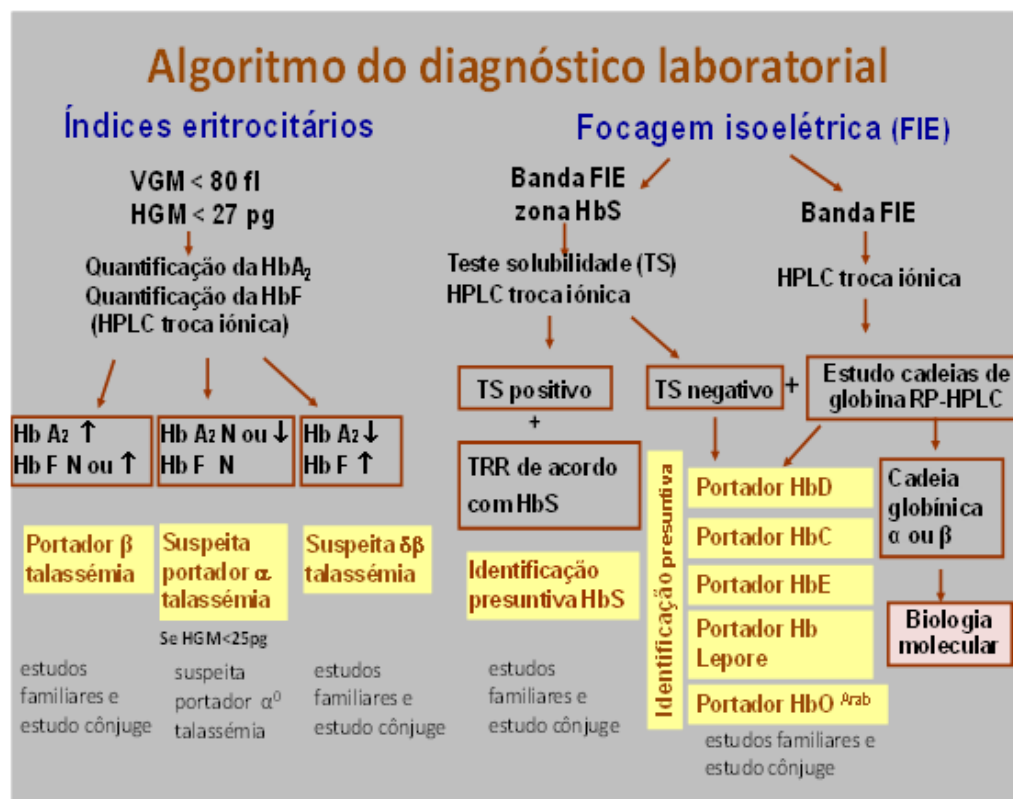
- ✓ A **identificação definitiva** requer a análise genética, ou sequenciação de proteínas por espectrometria de massa

A análise molecular deve ser realizada para a identificação definitiva de casos complexos ou quando os resultados hematológicos/bioquímicos não são conclusivos

Hemoglobinas variantes com mobilidade eletroforética semelhante à da Hemoglobina S

Objetivo: Caracterizar e identificar as variantes de Hb com mobilidade eletroforética semelhante à Hb S.

No período de janeiro de 2010 a agosto de 2017

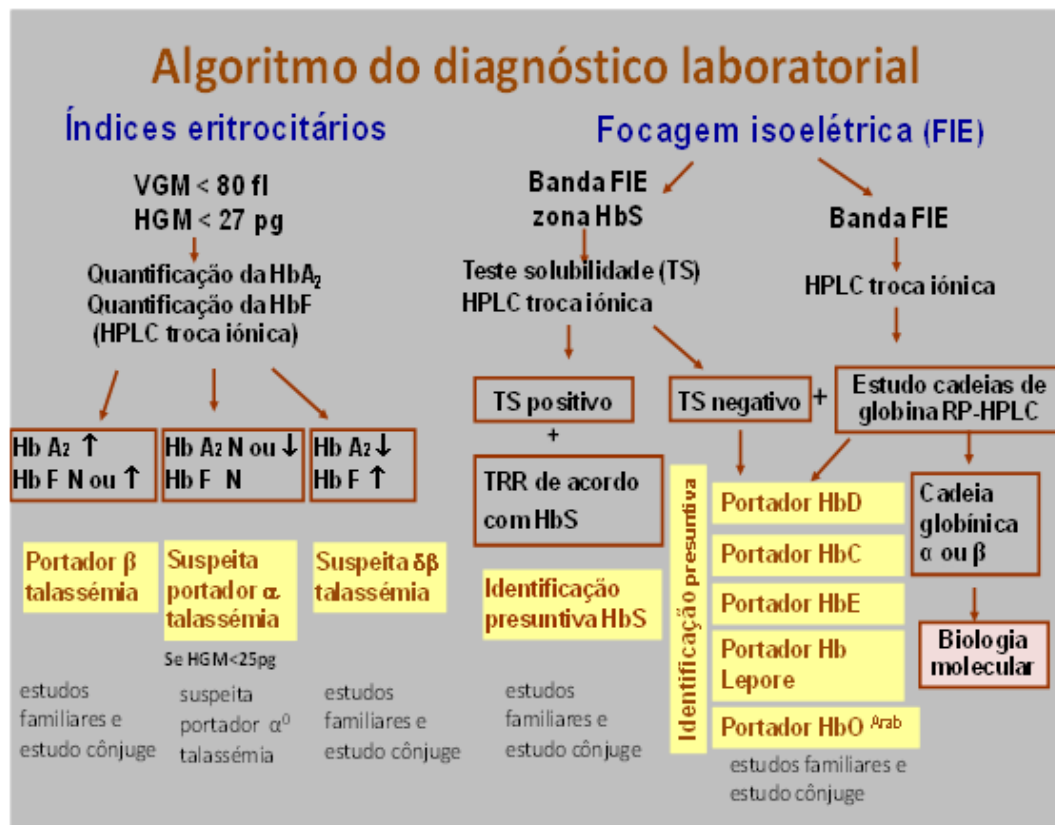


Hemoglobinas variantes com mobilidade eletroforética semelhante à da Hemoglobina S

Materiais e Métodos

- técnicas de primeira linha
- técnicas de confirmação do diagnóstico

- ✓ O eritrograma e a FIE/ HPLC troca iônica
- ✓ Hb S: pelo teste de solubilidade
- ✓ HPLC de fase reversa: caracterização e identificação das cadeias de globina



- ✓ A identificação definitiva das variantes de Hb raras. usando metodologia convencional de genética molecular (PCR e sequenciação de Sanger).

Hemoglobinas variantes com mobilidade eletroforética semelhante à da Hemoglobina S

Resultados e Discussão

No período de janeiro de 2010 a agosto de 2017 foram detetados no nosso laboratório 660 casos de variantes de Hb com mobilidade semelhante à Hb S.

467 Hb S (70,8%)

101 Hb D (15,3%)

74 Hb Lepore (11,2%)



Identificação presuntiva:

Padrão de migração da FIE

HPLC de troca iónica

Resultado do teste de solubilidade

HPLC de fase reversa das cadeias de globina

18 variantes de Hb raras (2,7%),

11 casos (1,7%) Identificação definitiva por **genética molecular**:

Hb Maputo (1), Hb G-Coushata (1), Hb Summer Hill (1), Hb Setif (1), Hb G

Waimanalo (1), Hb D Iran (1), Hb Oleander (1), Hb Ottawa (1), Hb Etobicoque (1), Hb

Matsue-Oki (1) e Hb Q-India (1).

Hemoglobinas variantes com mobilidade eletroforética semelhante à da Hemoglobina S

Resultados e Discussão

No período de janeiro de 2010 a agosto de 2017 foram detetados no nosso laboratório 660 casos de variantes de Hb com mobilidade semelhante à Hb S.

467 Hb S (70,8%).

101 Hb D (15,3%)

74 Hb Lepore, (11,2%)

18 variantes de Hb
raras (2,7%),

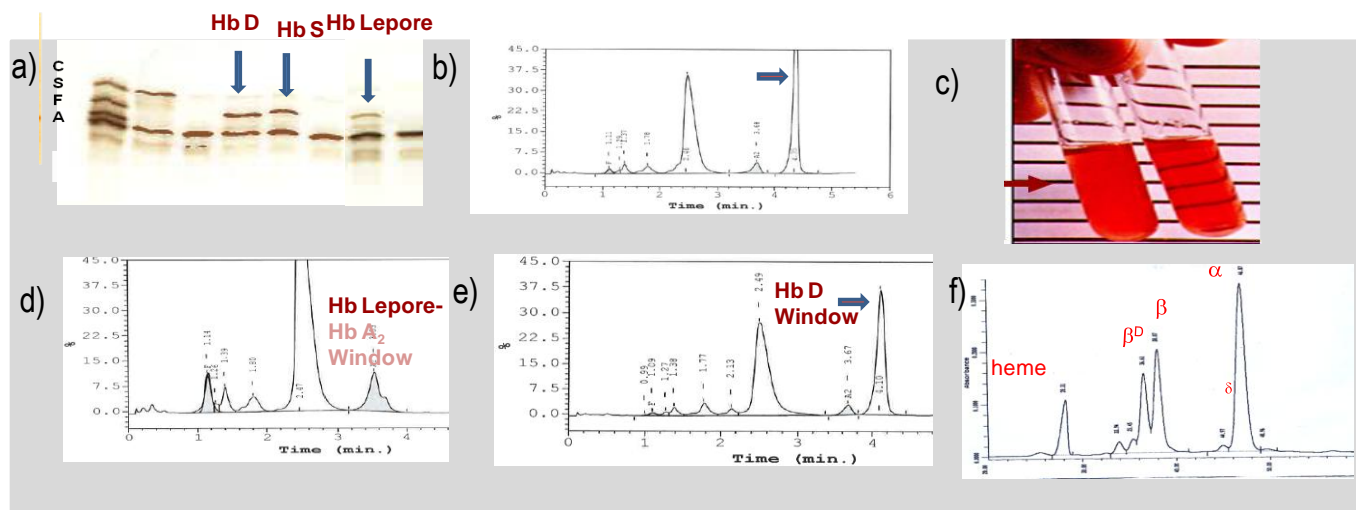


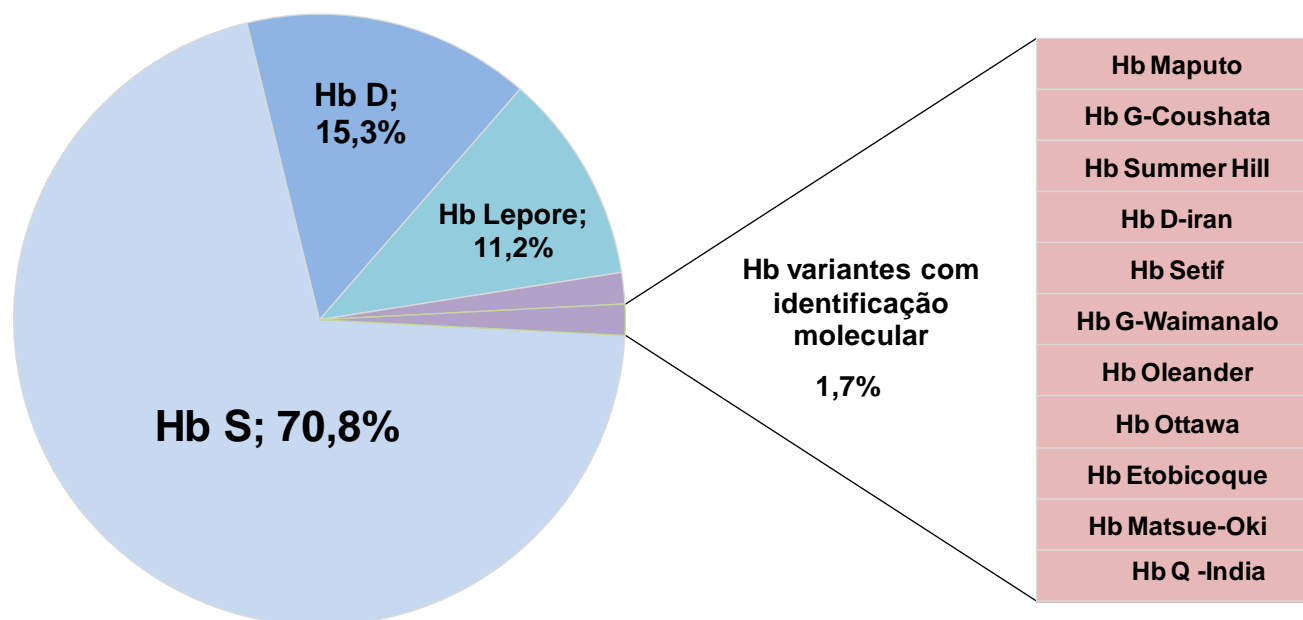
Figura 2- Resultados de diferentes metodologias para a identificação presuntiva da **Hb S**, **Hb D** e **Hb Lepore**. **a)** Padrão da focagem isoeletrica; **b)** Pico na janela da Hb S (38,3%) por HPLC de troca iônica; **c)** Teste de solubilidade positivo para Hb S; **d)** Pico na janela da Hb A₂ (11,6%) por HPLC de troca iônica indicativo de Hb Lepore; **e)** Pico na janela da Hb D (37,3%) por HPLC de troca iônica; **f)** HPLC de fase reversa das cadeias de globina, revelando a presença de cadeias β^D e cadeias β normais

Hemoglobinas variantes com mobilidade eletroforética semelhante à da Hemoglobina S

Resultados e Discussão

No período de **janeiro de 2010 a agosto de 2017** foram detetados no nosso laboratório **660 casos de variantes de Hb com mobilidade semelhante à Hb S**.

	Hb S	Hb D	Hb Lepore	Com identificação molecular	Sem Identificação molecular
No	467	101	74	11	7
%	70,8	15,3	11,2	1,7	1,0



Hemoglobinas variantes com mobilidade eletroforética semelhante à da Hemoglobina S

Resultados e Discussão

Características bioquímicas e moleculares das 18 variantes de Hb raras (2,7%),

Tabela 1- Características bioquímicas e moleculares das hemoglobinas variantes raras com mobilidade eletroforética semelhante à Hemoglobina S

Identificação Presuntiva											
Focagem Isoelétrica						Mobilidade Semelhante à Hemoglobina S					
Prova solubilidade						Negativo					
HPLC troca iônica	Pico na zona HbD	Pico na zona HbA2	Pico na zona HbS	Pico na zona HbA2	Pico na zona Hb S/desconhecido	Pico na zona HbS / HbD	Pico na zona HbS ou desconhecido	Pico na zona HbS / Hb D	Pico na zona HbS	Pico na zona HbC	Pico zona HbS
HPLC fase reversa cadeias globina	variante Hb cadeia beta	variante Hb cadeia beta	variante Hb cadeia beta	variante Hb cadeia beta	variante Hb cadeia beta	variante Hb cadeia alfa	variante Hb cadeia alfa	variante Hb cadeia alfa	Silenciosa	Silenciosa	variante Hb cadeia alfa
Identificação Definitiva											
Biologia molecular	Hb Maputo	Hb G-Coushata	Hb Summer Hill	Hb D-Iran	Hb Setif	Hb Oleander	Hb Etobicoque	Hb Ottawa	Hb Matsue-OkI	Hb G-Waimanalo	Hb Q-India
	HBB:c.142 G>T	HBB:c.68A>C	HBB:c.157G>C	HBB:c.67G>C	HBA2:c.283G>T	HBA2:c.349G>C (ou HBA1)	HBA2:c.255C>A (ou HBA1)	HBA2:c.46G>C HBA1) ou	HBA2:c.255C>G	HBA2:c.193G>A	HBA1:c.193G>C

Hemoglobinas variantes com mobilidade eletroforética semelhante à da Hemoglobina S

Resultados e Discussão

11 casos (1,7%) identificados por estudos de genética molecular::

Hb Maputo (1), **Hb G-Coushata** (1), Hb Summer Hill (1), Hb Setif (1), Hb G Waimanalo (1), Hb D Iran (1) Hb Oleander (1), Hb Ottawa (1), Hb Etobicoque (1), Hb Matsue-OkI (1) e Hb Q-India (1).

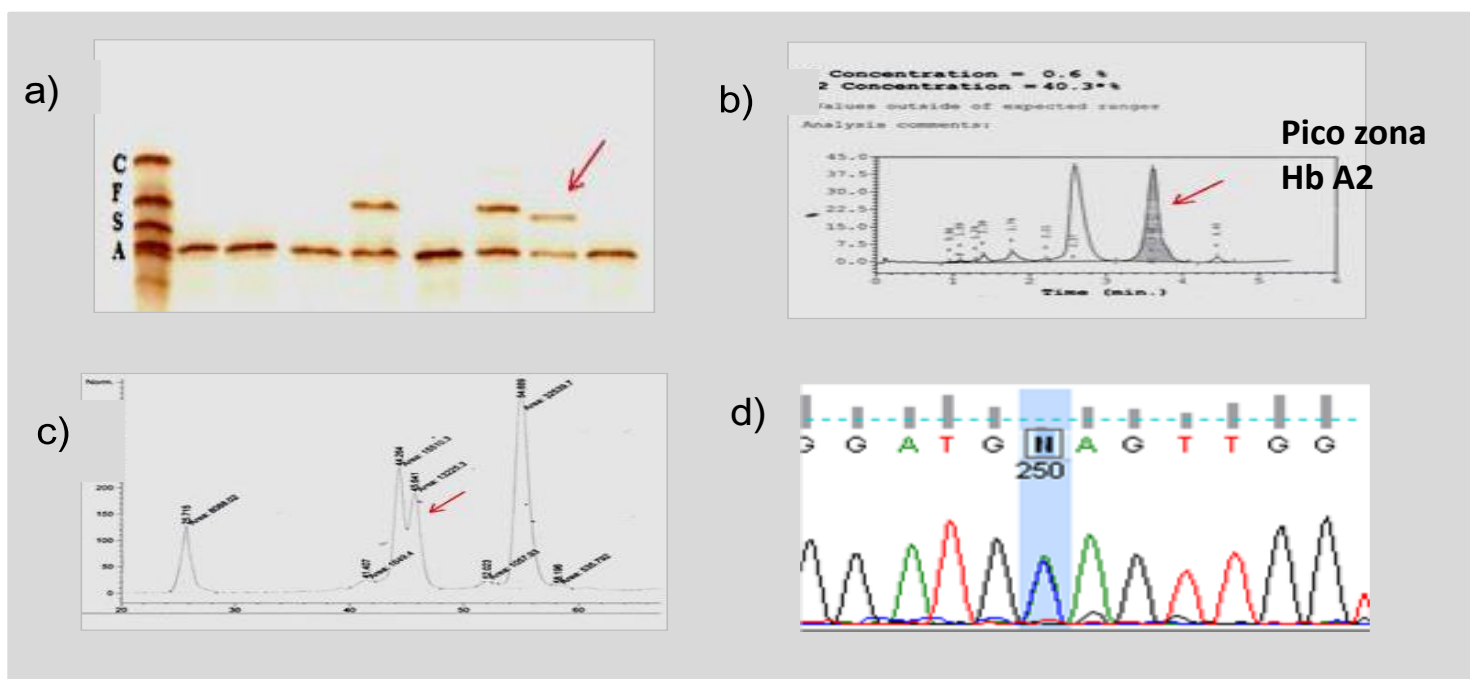


Figura 3 - Caracterização bioquímica e identificação molecular de variantes raras de cadeia beta - **Hb G-Coushata**. **a)** Padrão de migração na FIE; **b)** HPLC de troca iônica mostrando um pico na zona da Hb A₂ (40.3%); **c)** HPLC de fase reversa das cadeias de globina, revelando a presença de uma cadeia β anormal; **d)** Eletroferograma parcial do exão 1 do gene *HBB* revelando heterozigotia para a variante: c.68A>C, p.Glu22Ala.

Hemoglobinas variantes com mobilidade eletroforética semelhante à da Hemoglobina S

Resultados e Discussão

11 casos (1,7%) identificados por estudos de genética molecular::

Hb Maputo (1), Hb G-Coushata (1), Hb Summer Hill (1), Hb Setif (1), Hb G Waimanalo (1), Hb D Iran (1) Hb Oleander (1), Hb Ottawa (1), Hb Etobicoque (1), **Hb Matsue-OkI (1)** e Hb Q-India (1).

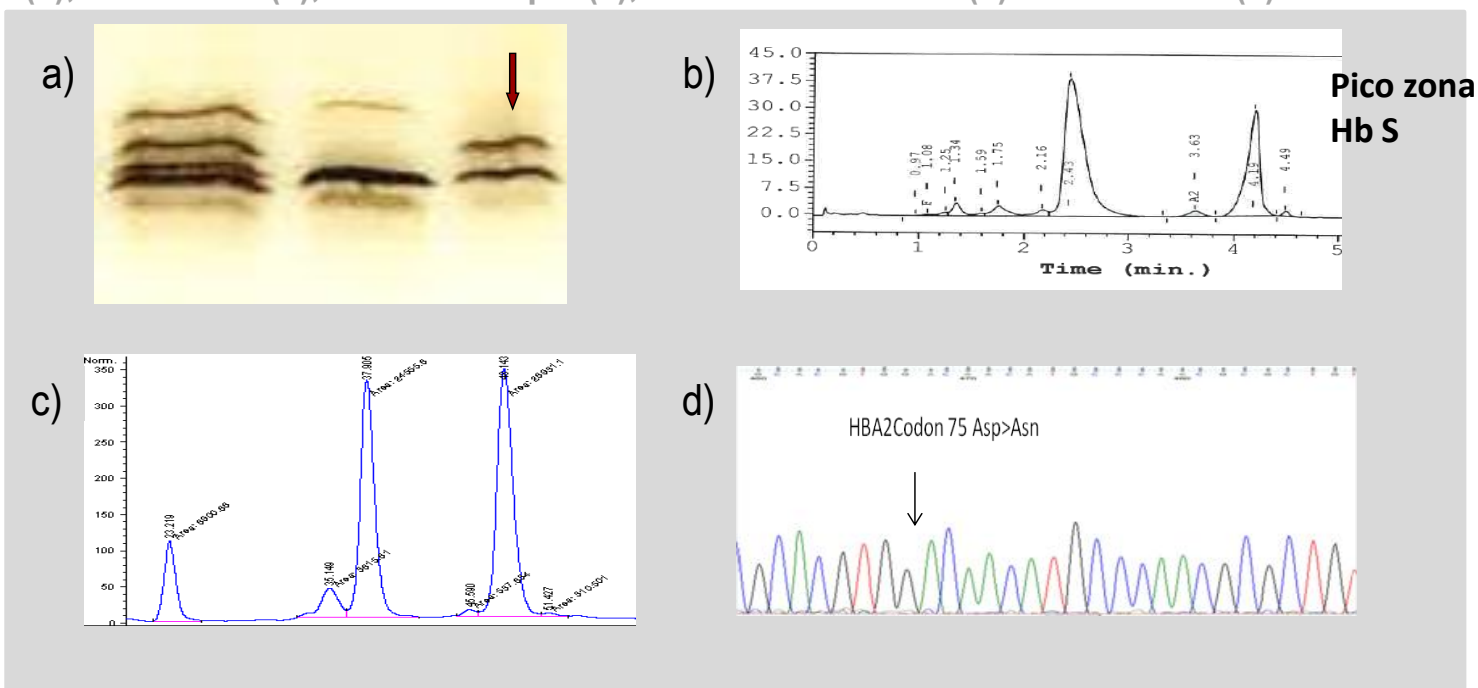


Figura 4 - Caracterização bioquímica e identificação molecular de variantes raras de cadeia alfa - **Hb Matsue OkI**. **a)** FIE - migração na zona Hb S; **b)** HPLC troca iônica- pico na zona da Hb S (29.4%); **c)** HPLC de fase reversa das cadeias da globina- padrão de eluição normal; **d)** Eletroferograma parcial do exão 2 do gene *HBA2*, revelando hemizigotia para a variante: c.226G>A. p.Asp75Asn.

Hemoglobinas variantes com mobilidade eletroforética semelhante à da Hemoglobina S

Resultados e Discussão

✓ Composto heterozigótico

Hb Matsue-Okii com a deleção α -talassêmica de 3,7Kb

✓ Dupla heterozigotia

Hb Q-India com β^0 -talassémia (c.316-149_*342delinsAAGTAGA).

Tabela 2- Fenótipo hematológico dos Compostos Genéticos Hb Matsue-Okii /del α tal 3,7Kb e da Dupla heterozigotia Hb Q-India/ β^0 talassémia

	Género/Idade	Hb (g/dL)	GV ($\times 10^{12}/L$)	Ht (%)	VGM (fL)	HGM (pg)	CHGM (g/dL)	RDW (%)	Hb variante(%)	Hb A ₂ (%)
Composto heterozigótico Hb Matsue-Okii /del α tal 3,7Kb	F/56 anos	10,5	4,69	33,5	71,4	22,4	31,3	17,6	29,4	1,6
Dupla Heterozigotia Hb Q-India/ β^0 talassémia	F/14 anos	11,8	6,25	38,8	62,0	18,9	33,4	16,5	17,4	4,7

Em ambos os casos, a presença de anemia microcítica e hipocrômica poderá ser explicada pela coexistência de talassémia (alfa ou beta talassémia)

Conclusão

A combinação dos resultados obtidos pelas diferentes metodologias bioquímicas permite a identificação presuntiva das variantes mais prevalentes, Hb S, Hb D e Hb Lepore, e direciona o estudo molecular para a identificação definitiva das variantes de Hb raras.

Revelou a importância da conjugação de diferentes metodologias bioquímicas para uma correta identificação das variantes mais comuns.

O diagnóstico hematológico e bioquímico correto acompanhado da análise molecular, quando aplicável, são essenciais para um adequado acompanhamento/tratamento clínico e aconselhamento genético dos doentes e dos seus familiares.

Hemoglobinas variantes com mobilidade eletroforética semelhante à da Hemoglobina S

Bibliografia

- [1] Ryan K. *et al.* Significant haemoglobinopathies: guidelines for screening and diagnosis. Br. J. Haematol., 2010, 149: 35-49.
- [2] Traeger-Synodinos J. *et al.* EMQN Best Practice Guidelines for molecular and haematology methods for carrier identification and prenatal diagnosis of the haemoglobinopathies. Eur. J. Hum. Genet., 2015. 23: 426-37.

Hemoglobinas variantes com mobilidade eletroforética semelhante à da Hemoglobina S



DECLARAÇÃO PÓSTER VENCEDOR

2º Congresso de Controlo da Qualidade Laboratorial para Países de Língua Portuguesa

XXI Jornadas Científicas do Conselho do Colégio de Análises e de Genética Humana da Ordem dos Farmacêuticos

X Jornadas Ibéricas de Análises Clínicas (OF-AEFA)

A Comissão Científica 2º Congresso de Controlo da Qualidade Laboratorial para Países de Língua Portuguesa, XXI Jornadas Científicas do Conselho do Colégio de Análises Clínicas e de Genética Humana da Ordem dos Farmacêuticos, X Jornadas Ibéricas de Análises Clínicas (OF-AEFA), que decorreu de 12 a 14 de outubro de 2017, declara que o poster intitulado *Hemoglobinas variantes com mobilidade eletroforética semelhante à da Hemoglobina S* da responsabilidade do(s) seguinte(s) autor(es) Armandina Miranda, Filomena Suanes, Sandra Copeto, Pedro Loureiro, Alcina Costa, Sandra Costa, Maria Teresa Seixas, João Gonçalves, Paula Faustino, foi distinguido como Melhor apresentação na forma de Painel.

Porto, 14 de outubro de 2017

O Presidente do Conselho do Colégio de Especialidade de Análises Clínicas e de Genética Humana da Ordem dos Farmacêuticos

Prof. Doutor Rui Pinto

O Presidente do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge

Dr. Fernando de Almeida



Muito obrigada