

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

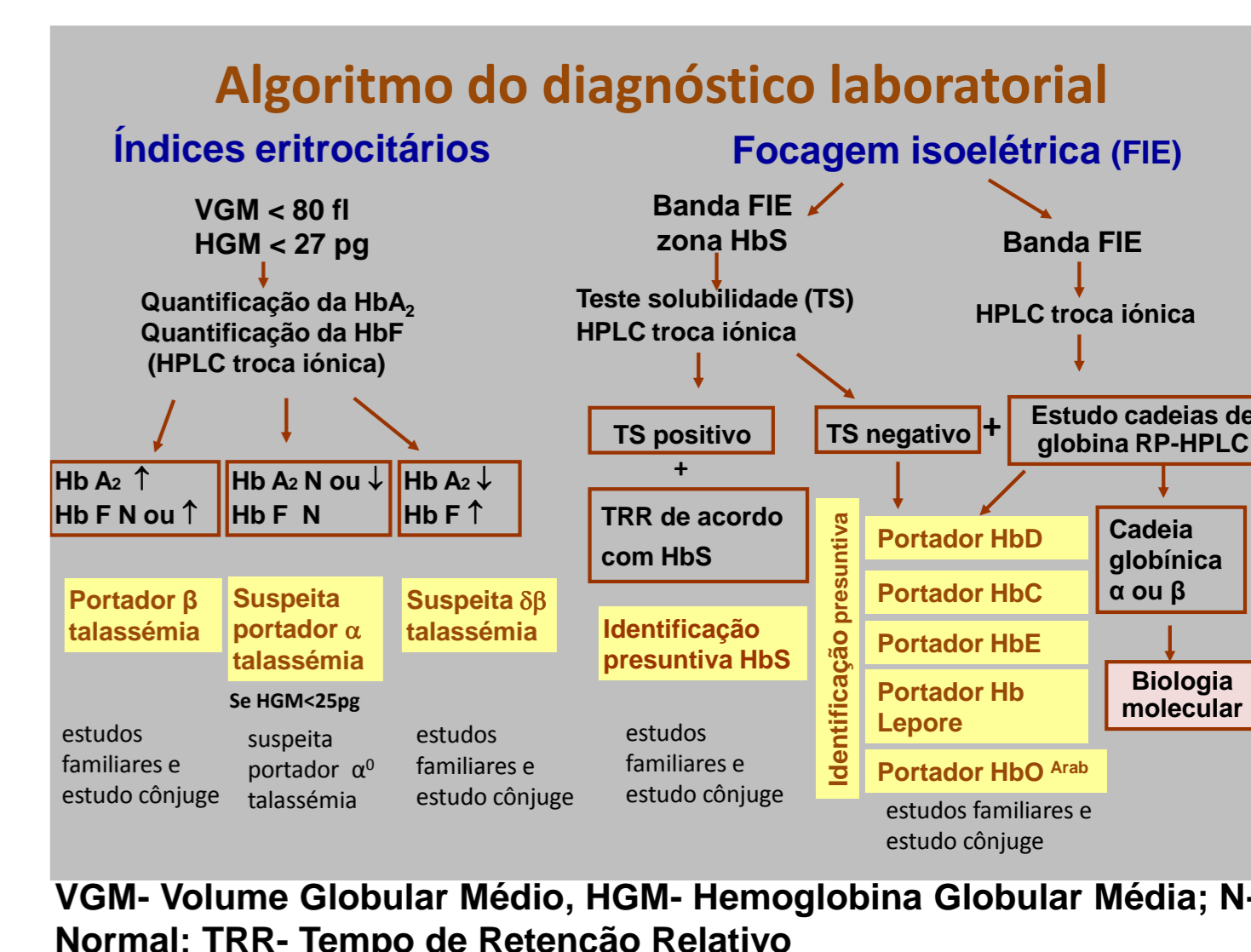
Introdução e Objetivo

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. As variantes das hemoglobinas são causadas por defeitos estruturais resultantes de alterações na sequência de aminoácidos nas cadeias de globina, sendo a Hb S a mais frequente e associada a patologia. As hemoglobinopatias são as únicas, entre todas as doenças genéticas, em que a deteção de portadores é possível por testes hematológicos e bioquímicos. No entanto, a análise molecular do respetivo gene, deve ser realizada para a identificação definitiva de casos complexos ou quando os resultados hematológicos/bioquímicos não são conclusivos. A identificação de hemoglobinopatias é frequentemente presuntiva, com base em tempos de retenção e padrões de migração, e deve ser baseada preferencialmente no mínimo em duas metodologias com princípios de separação diferentes. A identificação definitiva requer a análise do respetivo gene, espectrometria de massa ou sequenciação de proteínas^{1,2}. 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}.

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

Materiais e Métodos

A identificação/caracterização das hemoglobinopatias foi efetuada com base numa marcha analítica, utilizando-se técnicas de primeira linha e técnicas de confirmação do diagnóstico. A marcha analítica iniciou-se com os testes de rastreio, o eritrograma e a focagem isoelétrica (FIE) e/ou a cromatografia de troca aniónica das hemoglobinas (HPLC de troca iónica). As cadeias de globina variantes foram caracterizadas e classificadas em alfa ou beta por cromatografia de fase reversa das cadeias da globina (RP-HPLC). A Hb S foi confirmada pelo teste de solubilidade. A identificação definitiva das variantes de Hb raras foi realizada usando metodologia convencional de genética molecular (PCR e sequenciação de Sanger).



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. Destes, 467 foram confirmados como sendo Hb S (70,8%). A Hb D e a Hb Lepore, também clinicamente relevantes, foram prevalentes com, respetivamente, 101 (15,3%) e 74 (11,2%) casos. Os restantes 18 casos foram classificados como variantes de Hb raras (2,7%), tendo sido 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-Okí (1) e Hb Q-Índia (1). (Figura 1 e Tabela 1).

A identificação presuntiva das variantes de Hb, Hb S, Hb D e da Hb Lepore, foi baseada no padrão de migração da FIE e nos tempos de retenção da cromatografia de troca iónica, assim como no resultado do teste de solubilidade e no comportamento cromatográfico do HPLC de fase reversa das cadeias de globina (Figura 2). A análise molecular proporcionou a identificação definitiva das variantes de Hb raras (Figuras 3 e 4). A Hb Matsue-Okí foi encontrada como composto heterozigótico com a deleção α-talassémica de 3,7Kb e a Hb Q-Índia, foi encontrada em dupla heterozigotia com β⁰-talassémia (c.316-149_*342delinsAAGTAGA). Em ambos os casos, a presença de anemia microcítica e hipocrómica poderá ser explicada pela coexistência de talassémia (alfa ou beta talassémia). (Tabela 2).

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

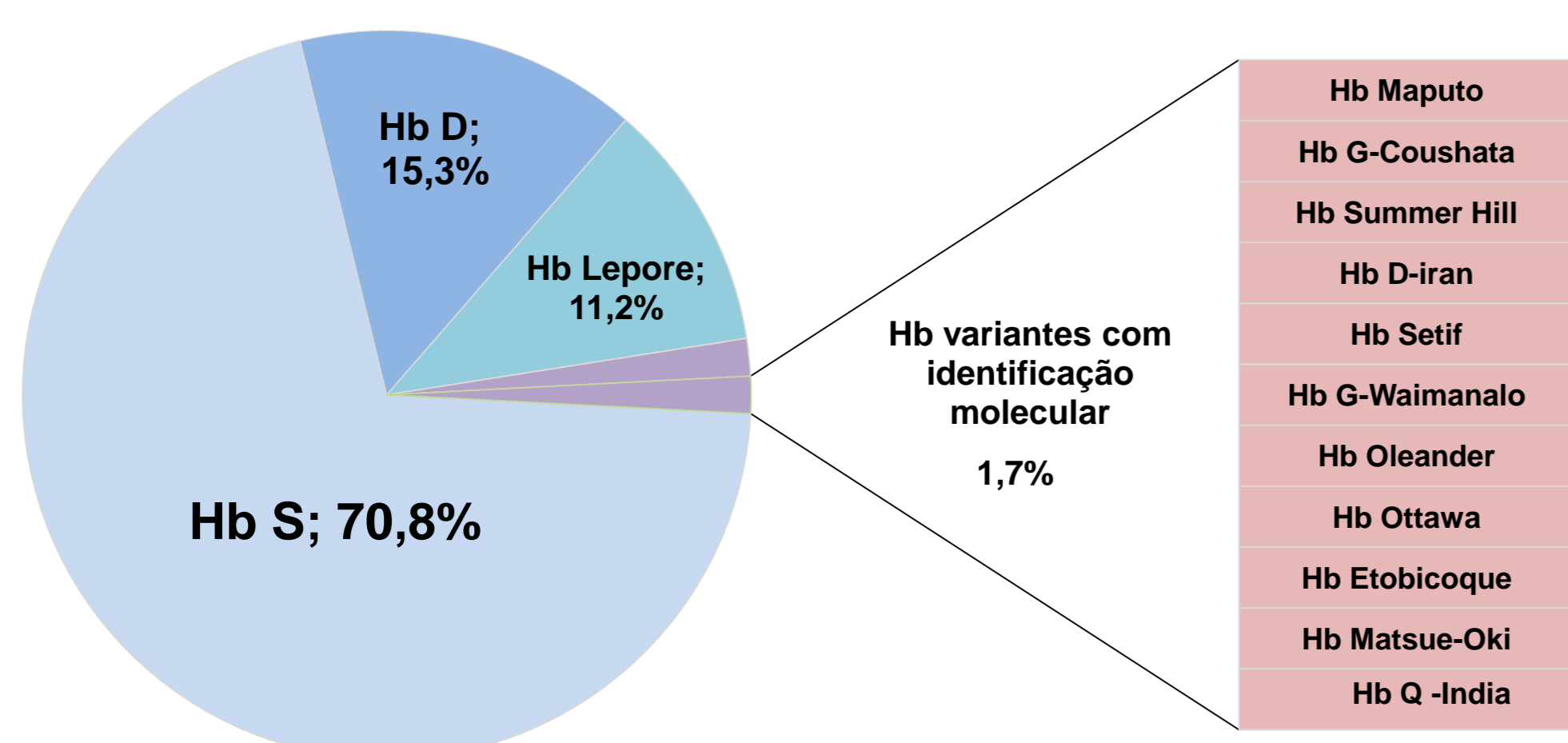


Tabela 1- Características bioquímicas e moleculares das hemoglobinas variantes raras com mobilidade eletroforética semelhante à Hemoglobina S

Identificação Presuntiva		Mobilidade Semelhante à Hemoglobina S											
Focagem Isoelétrica		Negativo											
Prova solubilidade		Negativo											
HPLC troca iónica		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 Hb S / Hb	Pico na zona HbS ou desconhecido	Pico na zona HbS / Hb D	Pico na zona HbS	Pico na zona HbC	Pico na 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 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-Okí	Hb G-Waimanalo	Hb Q-Índia	
		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.255G>A (ou HBA1)	HBA2:c.46G>C (ou HBA1)	HBA2:c.255C>G	HBA2:c.193G>A	HBA1:c.193G>C	

Tabela 2- Fenótipo hematológico dos Compostos Genéticos Hb Matsue-Okí /del α tal 3,7Kb e da Dupla heterozigotia Hb Q-Índia/β⁰talassémia

	Género/Idade	Hb (g/dL)	GV (x10 ¹² /L)	Ht (%)	VGM (fL)	HGM (pg)	CHGM (g/dL)	RDW (%)	Hb variante (%)	Hb A ₂ (%)
Composto heterozigótico Hb Matsue-Okí /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-Índia/β ⁰ talassémia	F/14 anos	11,8	6,25	38,8	62,0	18,9	33,4	16,5	17,4	4,7

Figura 1- Hemoglobinas variantes com mobilidade eletroforética semelhante à da Hemoglobina S detetadas e identificadas no nosso laboratório de 2010-2017.

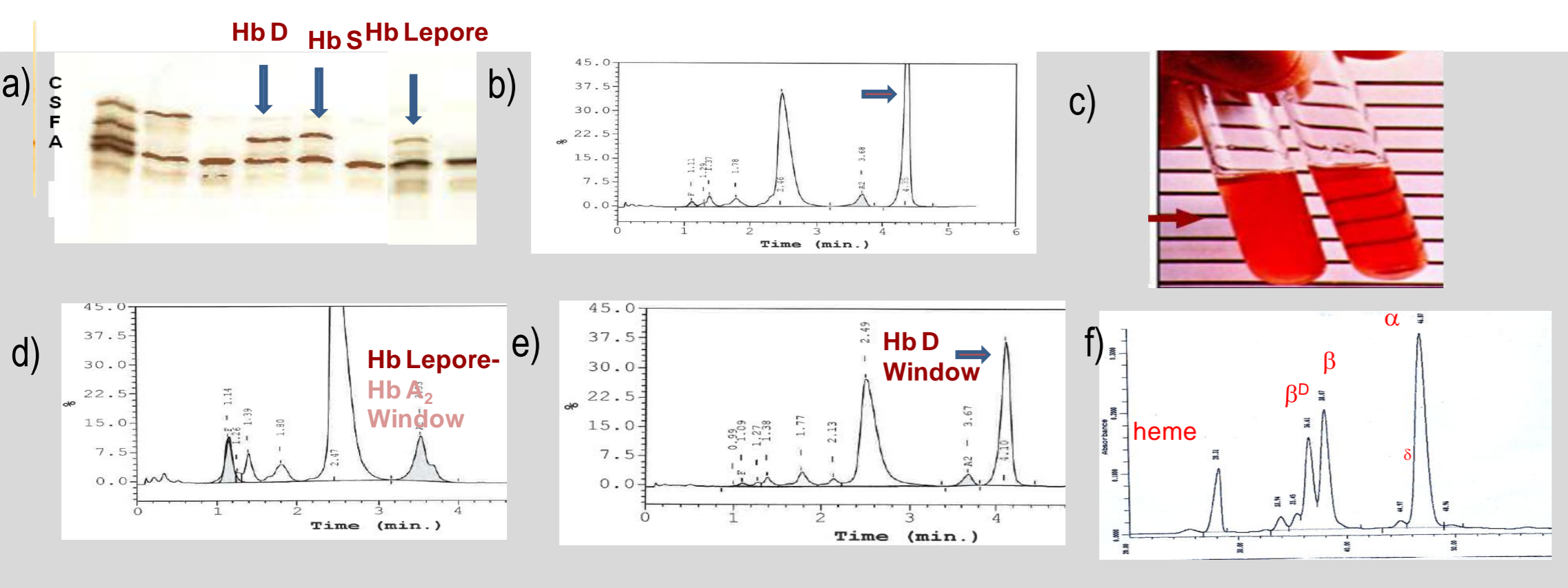


Figura 2- Resultados de diferentes metodologias para a identificação presuntiva da Hb S, Hb D e Hb Lepore. a) Padrão da focagem isoelétrica; b) Pico na janela da Hb S (38,3%) por HPLC de troca iónica; c) Teste de solubilidade positivo para Hb S; d) Pico na janela da Hb A₂ (11,6%) por HPLC de troca iónica indicativo de Hb Lepore; e) Pico na janela da Hb D (37,3%) por HPLC de troca iónica; f) HPLC de fase reversa das cadeias de globina, revelando a presença de cadeias β⁰ e cadeias β normais

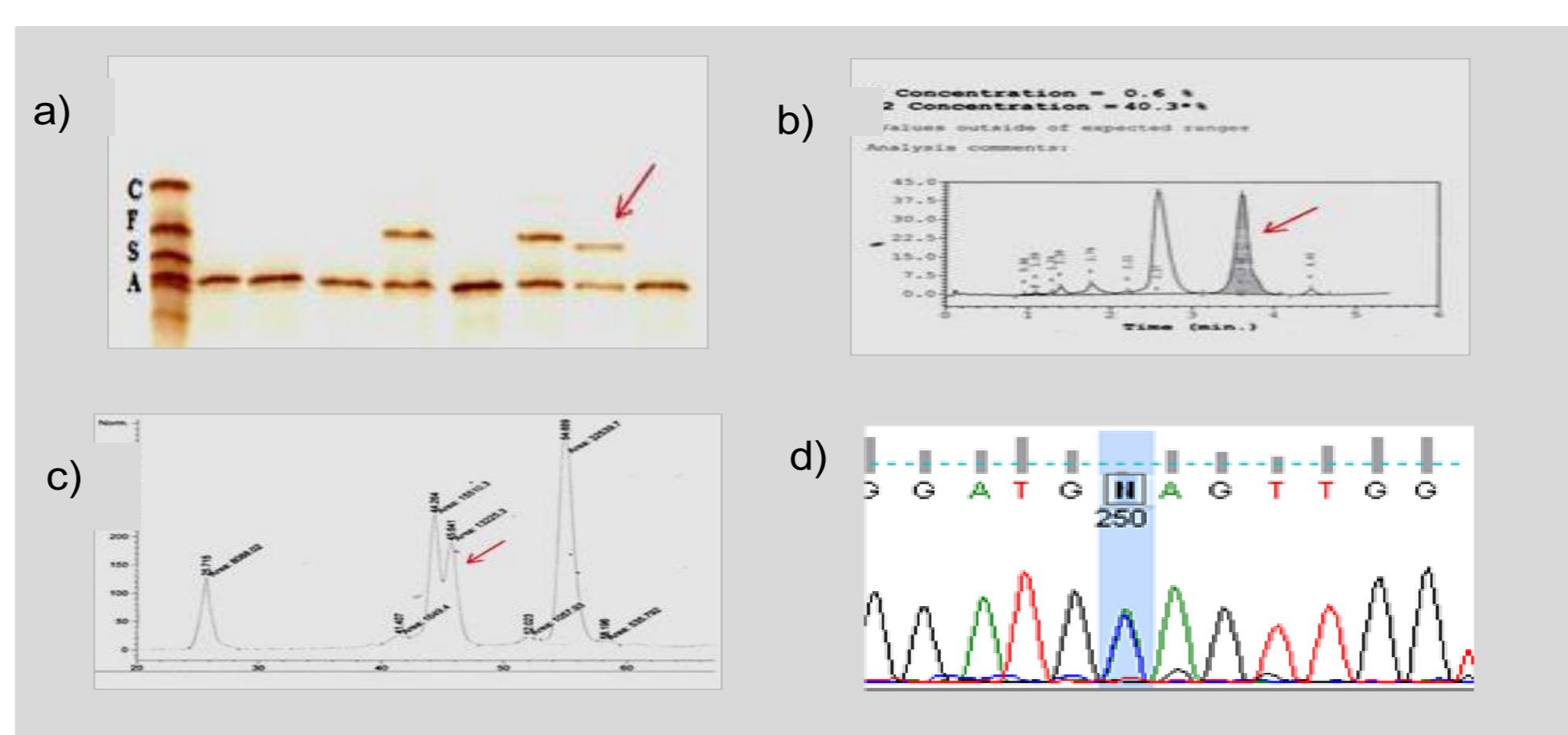


Figura 3 - Caracterização bioquímica e identificação molecular de variantes raras de cadeia beta - Hb G-Coushata. a) Padrão de migração na FIE; b) HPLC de troca iónica mostrando um pico na zona da Hb A₂ (40,3%); c) HPLC de fase reversa das cadeias de globina, revelando a presença de uma cadeia β anormal; d) Eletroferograma parcial do exão 1 do gene HBB revelando heterozigotia para a variante: c.68A>C, p.Glu22Ala.

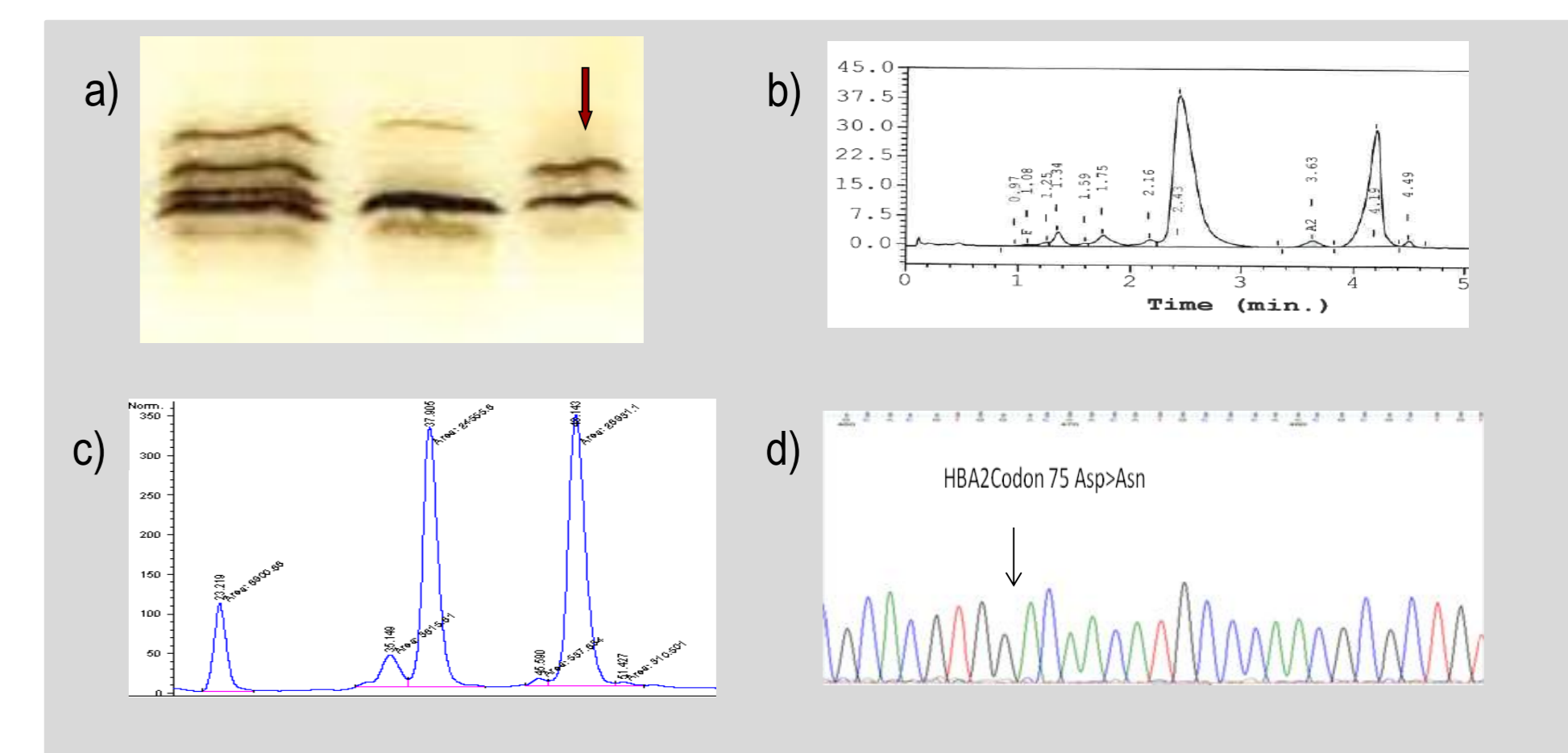


Figura 4 - Caracterização bioquímica e identificação molecular de variantes raras de cadeia alfa - Hb Matsue Okí. a) FIE - migração na zona Hb S; b) HPLC troca iónica-pico na zona da Hb S (29,4%); c) HPLC de fase reversa das cadeias da globina- padrão de eluição normal; d) Eletroferograma parcial do exão 2 do gene HBA2, revelando hemizigotia para a variante: c.226G>A, p.Asp75Asn.

Conclusão

Podemos concluir que 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. Este estudo também 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.

Bibliografia

- Ryan K. et al. Significant haemoglobinopathies: guidelines for screening and diagnosis. Br. J. Haematol., 2010, 149: 35-49.
- 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.