

Experiência no diagnóstico laboratorial das hemoglobinopatias

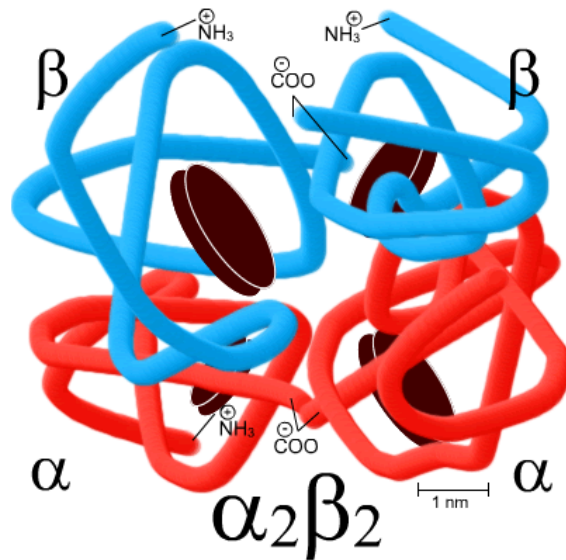
Armandina Miranda

armandina.miranda@insa.min-saude.pt

Departamento de Promoção da Saúde- DPS
INSA ,Lisboa

**42º Congresso Brasileiro de Análises Clínicas| 21 - 24 Junho 2015 –
Rio de Janeiro**

Hemoglobina



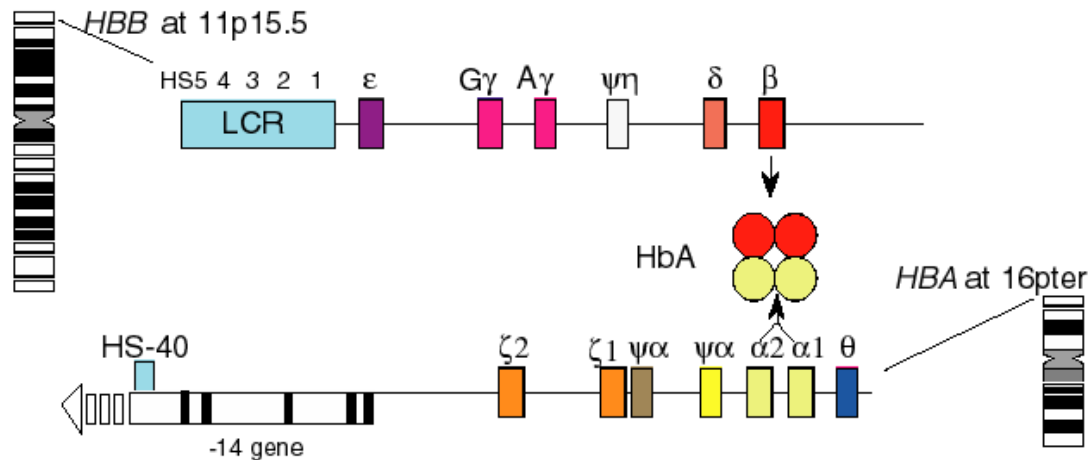
Parte proteica

2 cadeias tipo α

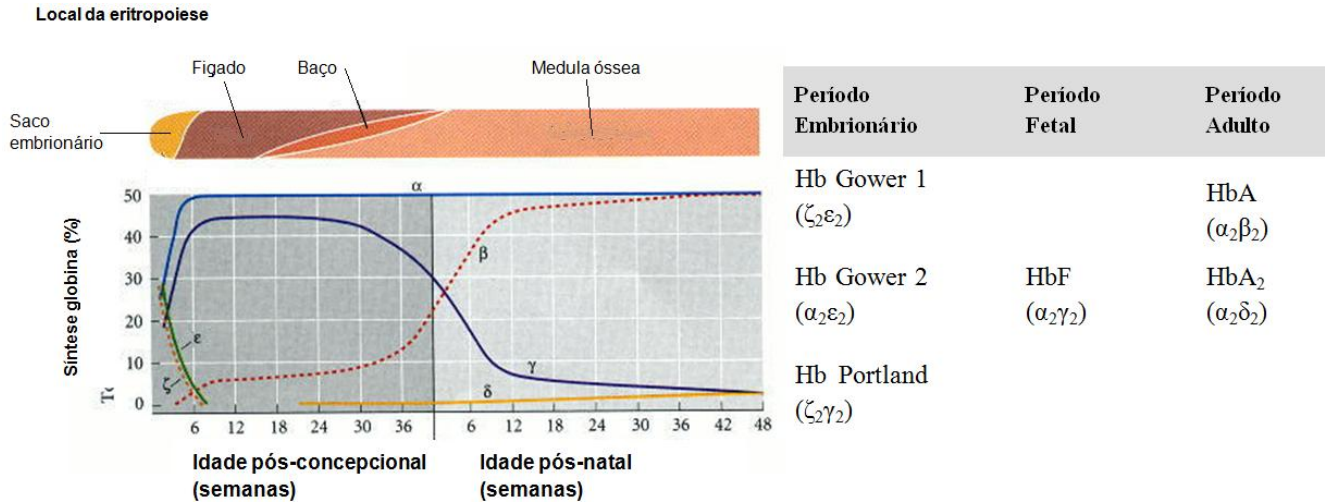
2 cadeias tipo não α

Grupo prostético:

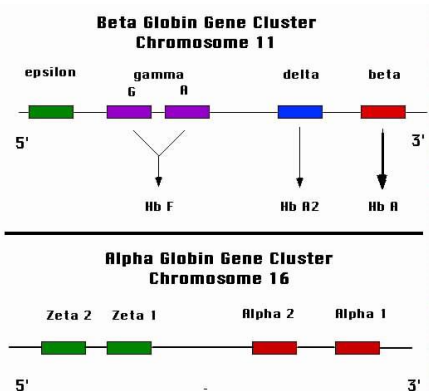
4 heme



Hemoglobinas humanas nos diferentes períodos do desenvolvimento



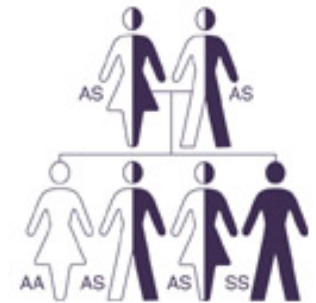
Hemoglobinas humanas na vida adulta



Hemoglobina	cadeias	percentagem
Hb A	$\alpha_2\beta_2$	96 a 98 % da Hb total
Hb A₂	$\alpha_2\delta_2$	2 a 3,0 % da Hb total
Hb F	$\alpha_2\gamma_2$	< 1 % da Hb total

Hemoglobinopatias

doenças monogénicas hereditárias de transmissão autossómica recessiva resultantes de mutações que afetam os genes responsáveis pela síntese das cadeias de globina da hemoglobina, ou as suas regiões regulatórias.



Podem ser classificadas em dois grupos principais:

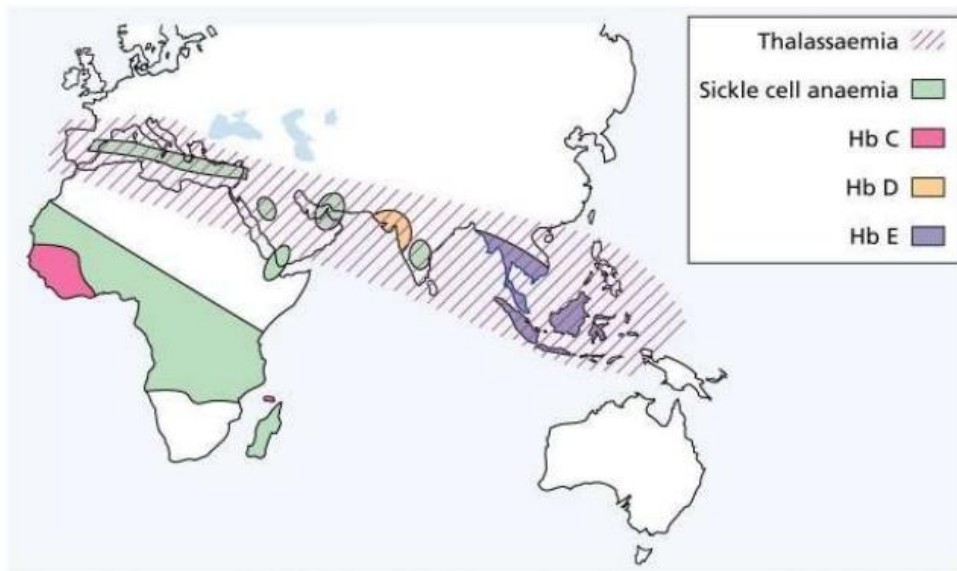
✓ Talassemias

Resultam da diminuição ou ausência de síntese de uma ou mais cadeias de globina. Ex β - talassemia, α - talassémia

✓ Variantes estruturais

Hemoglobinas de estrutura anómala- 95% devidas à substituição de um aminoácido, Ex Hb S, Hb C, Hb D, Hb E, Hb Lepore

As hemoglobinopatias são comuns nas populações de áreas onde a malária era endêmica



África,
bacia do Mediterrâneo,
Médio Oriente,
Ásia

Distribuição geográfica das talassemias e das variantes estruturais mais comuns



Mobilidade e migrações de populações, hemoglobinopatias difundiram-se, nomeadamente para Europa: **um problema de saúde pública global**

A drepanocitose e a β -talassemia constituem as doenças monogénicas humanas mais comuns e representam um grave problema de saúde pública em várias regiões do mundo

Estudos epidemiológicos - Portugal

1. Entre 1983 e 1985- 15208 amostras



➤ Cerca de **1-2%** de portadores entre a população nacional, com maior prevalência nos distritos do Sul.

Port β Tal -1,57% distrito de Évora

Port Hb S – 1,11% distrito de Beja

➤ Distribuição heterogênea de portadores:
zonas de prevalência valores > 5%

• **Portadores Hb S:** Curso inferior do rio Tejo (Coruche) e Curso inferior do rio Sado (Álcacer do Sal)

• **Portadores β Tal:** Bacia do rio Mira e Barlavento

Algarvio

2. Estudo populacional na região Centro - 2004 e 2008

Prevalência de hemoglobinopatias de **2,2%**

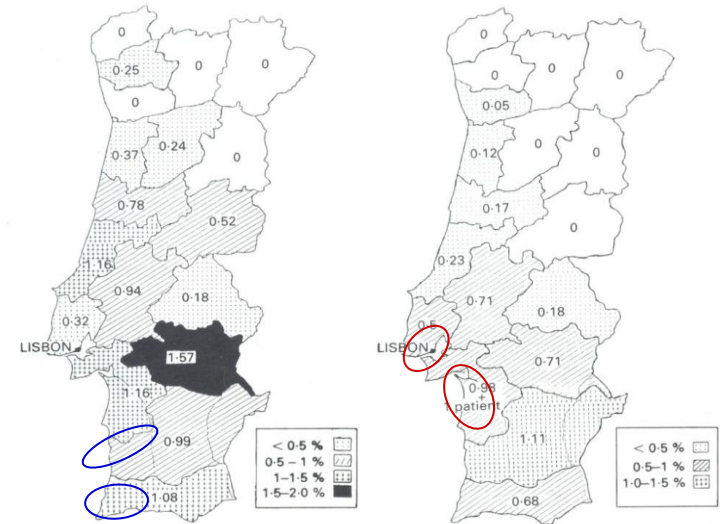


Figure 1 Prevalence of carriers of β thalassaemia trait (%).

Figure 2 Prevalence of carriers of haemoglobin S trait (%).

Martins *et al*, J. Med Genet 1993

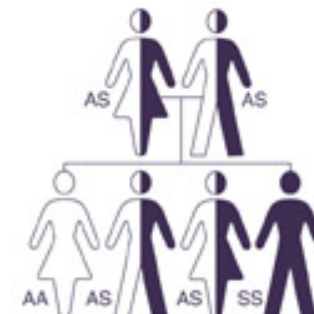
A forma mais eficaz de controlo desta patologia é a prevenção:

- Deteção e identificação de portadores de hemoglobinopatias**
- Aconselhamento genético de casais em risco**
- Oferta de diagnóstico pré-natal**
- Investigação em hemoglobinopatias**
- Realização de registos**
- Estabelecimento de centros de referência de acordo com as recomendações**
- Formação do pessoal de saúde e do público em geral**

A forma mais eficaz de controlo desta patologia é a prevenção:

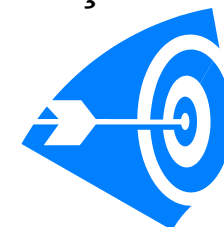
- Deteção e identificação de portadores de hemoglobinopatias e de casais em risco

rastreios e confirmações em colaboração com laboratórios de saúde pública, e outras entidades de saúde, públicas e privadas



- Aconselhamento genético de casais em risco
 - Oferta de diagnóstico pré-natal
 - Realização de registos
 - Investigação em hemoglobinopatias
- Estabelecimento de centros de referência de acordo com as recomendações

laboratório diferenciado na área das hemoglobinopatias, que dispõe de tecnologias com maior sensibilidade e especificidade. Colaboração com laboratório de diagnóstico molecular e com o laboratório de investigação.



- Formação do pessoal de saúde e do público em geral

estágios, atividades letivas, seminários, elaboração de folhetos de divulgação, colaboração com o PNAEQ



Metodologias utilizadas na caracterização analítica do fenótipo:

✓ Hemograma- eritrograma com índices eritrocitários

Hb, GV, HGM, VGM e RDW

***Cut-off* portadores talassémia: HGM<27 pg e VGM <80 fL**

✓ Técnicas electroforéticas

Focagem isoelétrica em gel de poliacrilamida

✓ Técnicas cromatográficas

HPLC de troca iónica da hemoglobina

HPLC de fase reversa das cadeias de globina

✓ Estudos funcionais da Hb

Teste de solubilidade da HbS

Teste de estabilidade - Teste do isopropanol

Pesquisa de corpos de inclusão de Hb H

Focagem isoelétrica em gel de poliacrilamida

A focagem isoelétrica é uma técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida, a potência constante e em gradiente estável de pH, e que permite a separação de proteínas de acordo com o seu ponto isoelétrico.

Permite detetar

Hb S

Hb D Punjab

Hb C

Hb E

Hb Lepore

Método com boa resolução

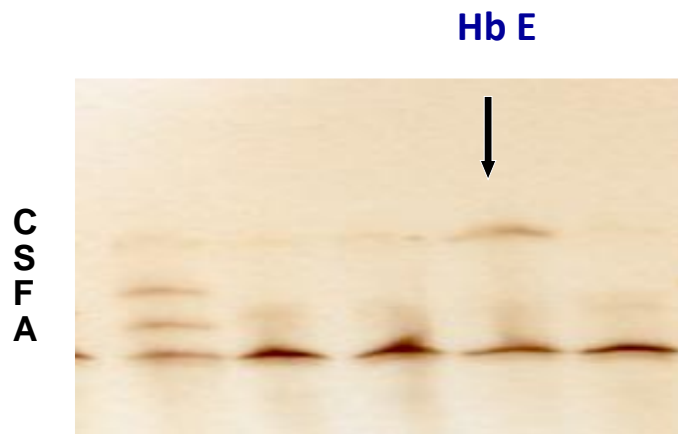
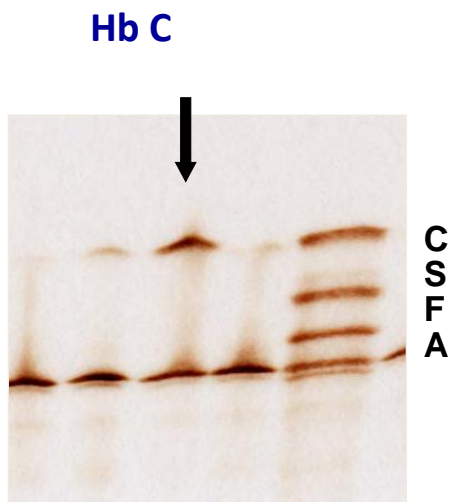
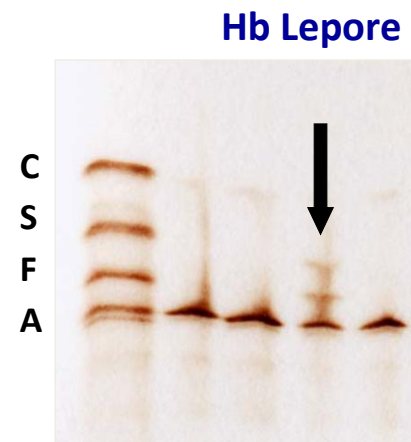
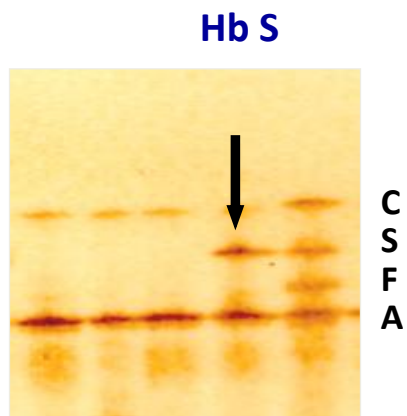
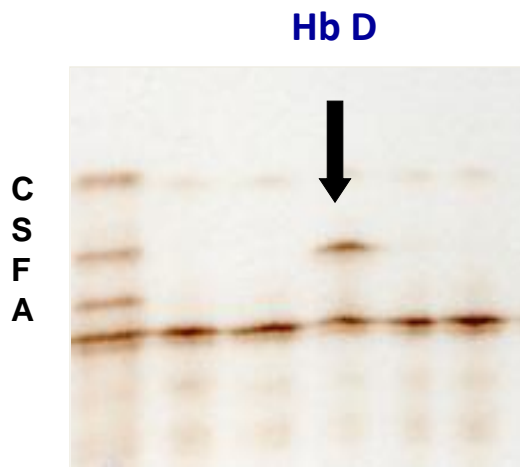
Separação Hb A da Hb F

Deteção variantes de Hb raras

✓ Técnicas electroforéticas

Focagem isoelétrica em gel de poliacrilamida

técnica de electroforese em gel de poliacrilamida, que permite a separação de proteínas de acordo com o seu ponto isoelétrico.



✓ Técnicas cromatográficas

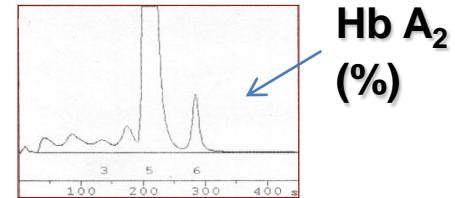
HPLC de troca iônica da hemoglobina

HPLC de fase reversa das cadeias de globina

Separa as hemoglobinas com base na sua carga global

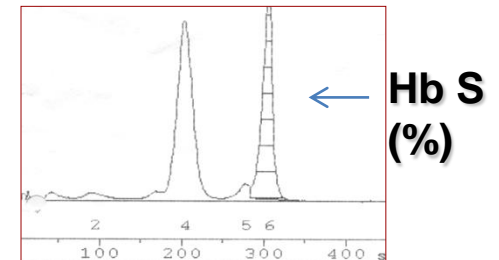
Frações normais :

- ✓ Quantificação relativa dos níveis de Hb A₂ – **Port β tal**
- ✓ Quantificação relativa dos níveis de Hb F– **Port δβ tal e HPFH**



Frações anómalas:

- ✓ Quantificação e Identificação presuntiva **de variantes de Hb** intervalos de tempos de retenção previamente estabelecidos: **Hb S, Hb D, Hb C, Hb E.**



✓ Técnicas cromatográficas

HPLC de troca catiónica

HPLC de fase reversa das cadeias de globina

Cromatografia Líquida de Alta Eficiência de Fase Reversa - RP-HPLC

Leone *et al* (1985) e Wacjman *et al* (2002)

Mecanismo de retenção :

A separação das cadeias de globina é baseada essencialmente na sua diferença de hidrofobicidade.

Permite:

- ❖ Identificação presuntiva e quantificação de variantes estruturais da hemoglobina
- ❖ Detetar variantes de hemoglobina neutras
- ❖ Identificação das cadeias $G\gamma$ e $A\gamma$ da Hb F – HPFH, β talassémia, drepanocitose



Representação do equipamento HPLC

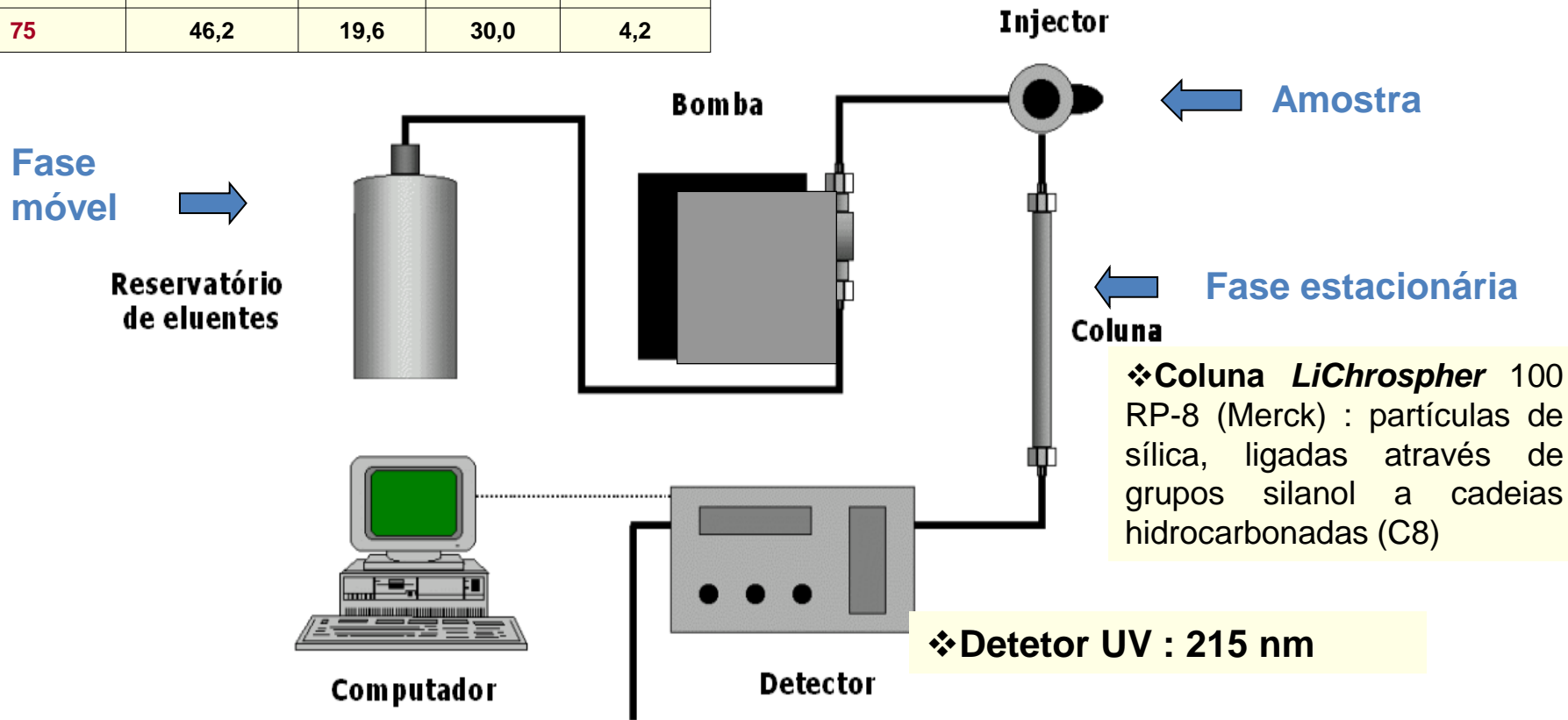
✓ Técnicas cromatográficas

HPLC de troca catiónica

HPLC de fase reversa das cadeias de globina

Tempo (min)	Acetonitrilo (mL)	Metanol (mL)	NaCL 0,155M pH 2,7 (mL)	H ₂ O desionizada (mL)
0	31,0	31,2	30,0	7,8
75	46,2	19,6	30,0	4,2

❖ Separação em Gradiente: 75min., fluxo 0,7 mL/min



Representação esquemática de um cromatógrafo de HPLC

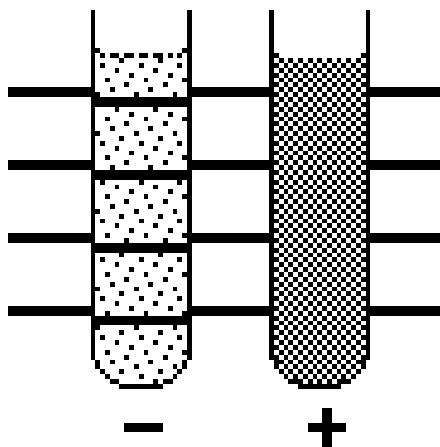
✓ Estudos funcionais da Hb

Teste de solubilidade da HbS

Teste de estabilidade - Teste do isopropanol

Pesquisa de corpos de inclusão de Hb H

Teste qualitativo que se baseia no facto da Hb S na sua forma desoxigenada (reduzida) polimerizar quando em solução de fosfatos de alta molaridade contendo um agente redutor (ditionito de sódio).



Positivo

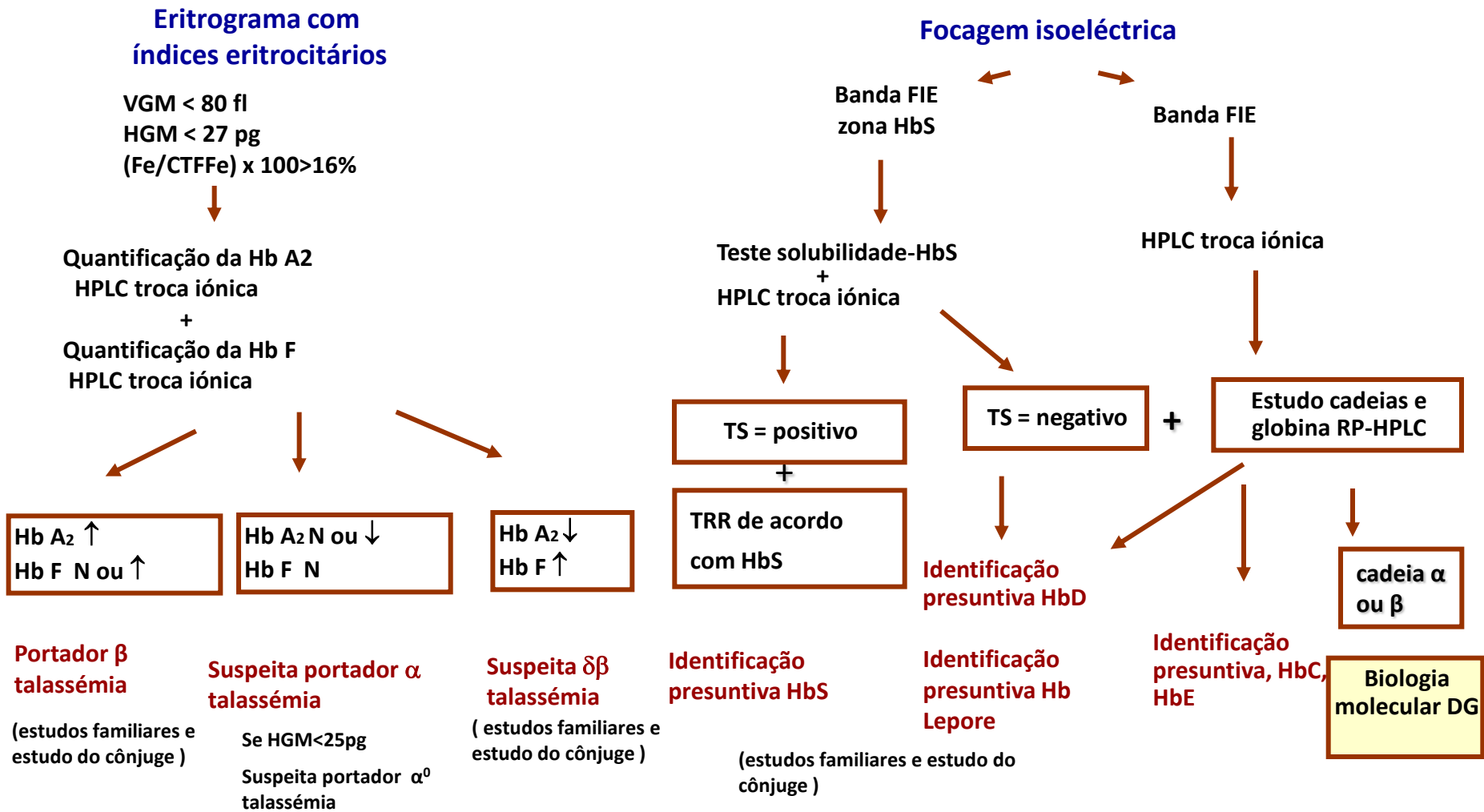
Antenatal screening: combinations that give rise to the risk of a foetus affected by a severe haemoglobinopathy

(adapted from the work of Prof. B. Modell and published by the UK National Screening Committee)

		Mother										
Father	Carrier of:	Hb S	β -thalassaemia	$\delta\beta$ -thalassaemia	Hb Lepore	Hb E	Hb O _{Arab}	Hb C	Hb D _{Punjab}	HPFH*	α^0 -thalassaemia	α^+ -thalassaemia
		Hb S	■	■	■	■	■	■	■	■	■	
	β -thalassaemia	■	■	■	■	■	■	■	■	■		
	$\delta\beta$ -thalassaemia	■	■	■	■	■	■	■	■	■		
	Hb Lepore	■	■	■	■	■	■	■	■	■		
	Hb E	■	■	■	■	■	■	■	■	■		
	Hb O _{Arab}	■	■	■	■	■	■	■	■	■		
	Hb C	■	■	■	■	■	■	■	■	■		
	Hb D _{Punjab}	■	■	■	■	■	■	■	■	■		
	HPFH*	■	■	■	■	■	■	■	■	■		
	α^0 -thalassaemia										■	■
	α^+ -thalassaemia										■	■

- Serious risk: to offer counselling and antenatal diagnosis
- Less serious risk: to offer counselling and further investigation maybe required
- No risk

Fluxograma do diagnóstico laboratorial

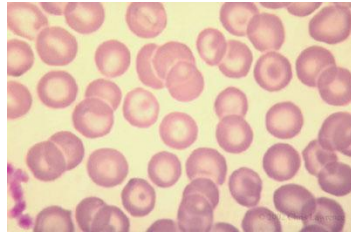


Portador de beta-talassemia

Sexo: M
Idade: adulto
Origem: caucasiana

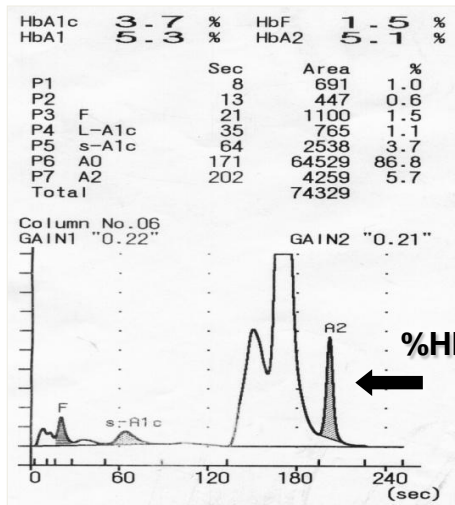
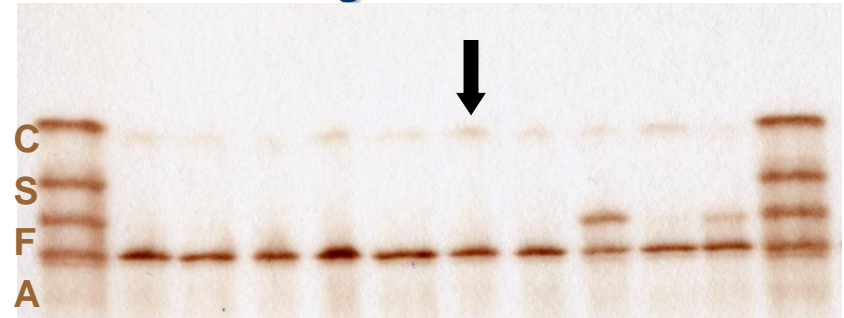
Hemograma

Hb=12,6 g/dL
G.V.= $6,21 \times 10^{12}/L$
Hct=0,386
VGM=62,2 fL
HGM=20,3 pg
CHGM=32,6 g/dL
RDW=16,4%

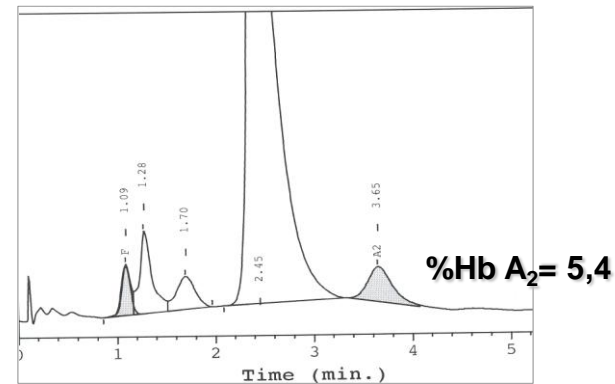


Esfregaço de sangue periférico após coloração - GV microcíticos, hipocrômicos

Focagem Isoelétrica



HPLC - HA 8160



HPLC - Variant II

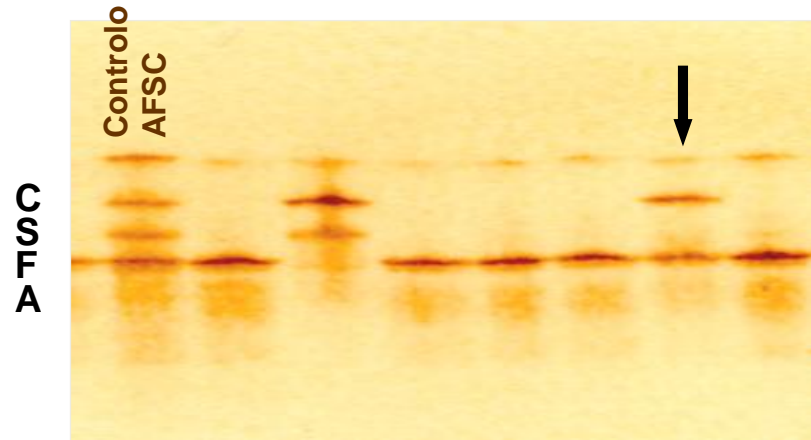
Portador de Hb S

Sexo: F
 Idade: 33 anos
 Origem: -

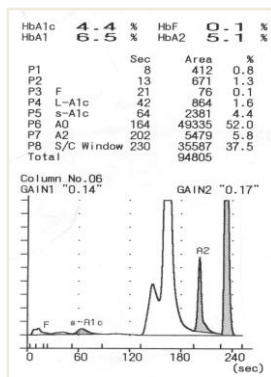
Hemograma

Hb=12,4 g/dL
 G.V.= $4,52 \times 10^{12}/L$
 Hct=0,379
 VGM=83,9 fL
 HGM=27,5 pg
 CHGM=32,7g/dL
 RDW=13,7%

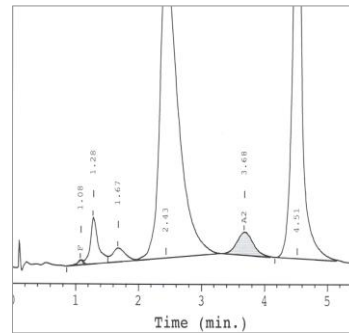
Focagem Isoelétrica



HPLC troca iônica



HPLC - HA 8160



HPLC - Variant II

Teste de solubilidade:

Positivo



Portador de Hb Lepore

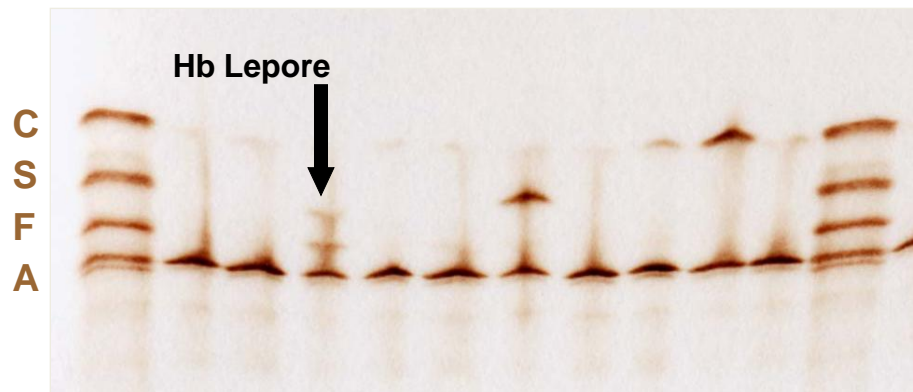
Amostra

Sexo: F
Idade: 15 meses
Origem: -

Hemograma

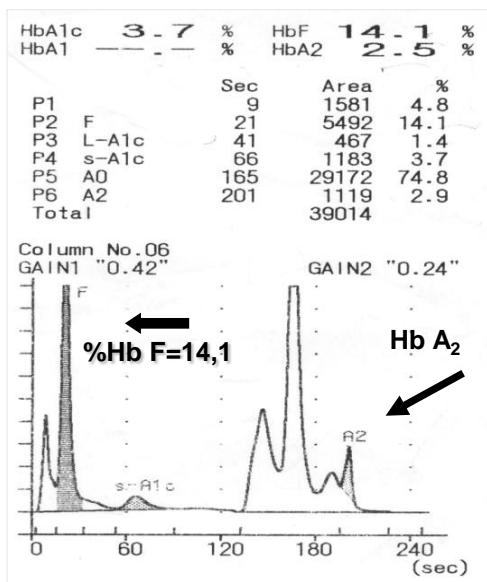
Hb=10,1 g/dL
G.V.= $4,10 \times 10^{12}/L$
Hct=0,302
VGM=73,5 fL
HGM=24,7 pg
CHGM=33,6 g/dL
RDW=18,7%

Focagem Isoelétrica

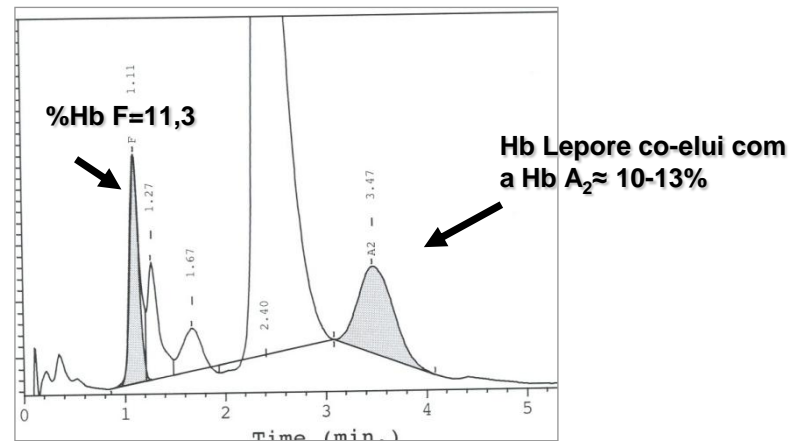


Cromatografias

HPLC – HA 8160



HPLC – Variant II da Biorad



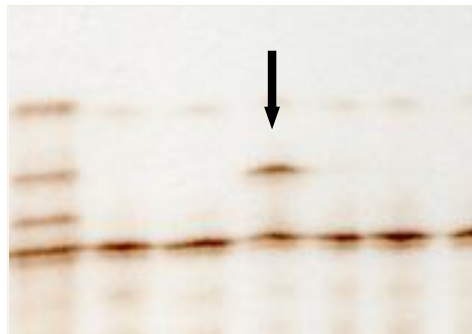
Portador de Hb D

Sexo- F
Idade-adulto
Origem Geog.-Beja

Hemograma

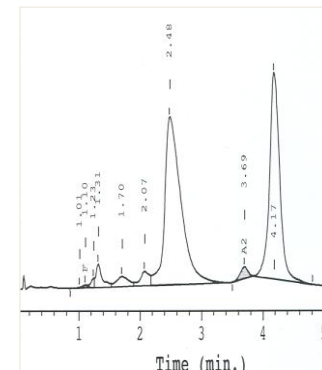
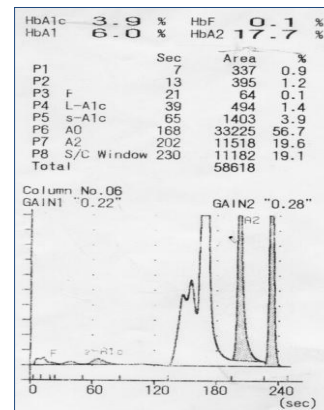
Hb=13,2g/dL
G.V.= $4,07 \times 10^{12}/L$
Hct=0,399
VGM=98,1 fL
HGM=32,5pg
CHGM=33,1 g/dL
RDW=12,3%

Focagem Isoelétrica



C
S
F
A

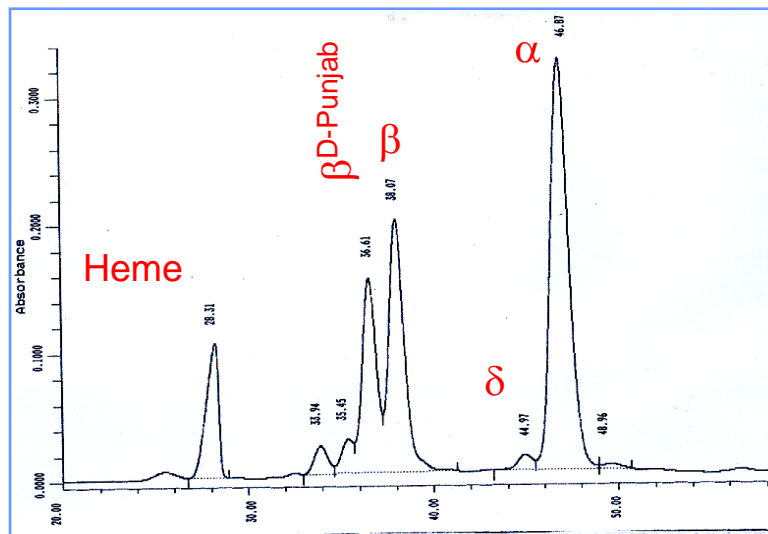
HPLC – troca iônica



HPLC de Fase Reversa das cadeias de globina

Teste de solubilidade:

Negativo.



Área α = 370,025
Área não α = 378,854

Variante Hb cadeia β

$$TRR = \frac{tr \beta^x}{tr \beta}$$

Hb D-Punjab = 40,9%

Portador de Hb E

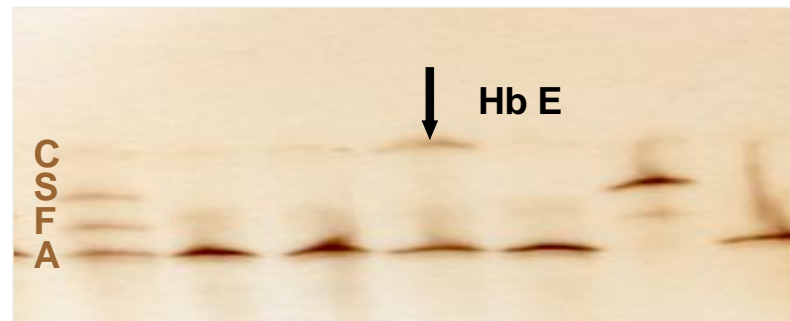
Amostra

Sexo: M
Idade: 44 anos
Origem: -

Hemograma

Hb=14,5 g/dL
G.V.=5,61x10¹²/L
Hct=0,418
VGM=74,5 fL
HGM=25,2 pg
CHGM=33,8 g/dL
RDW=13,3%

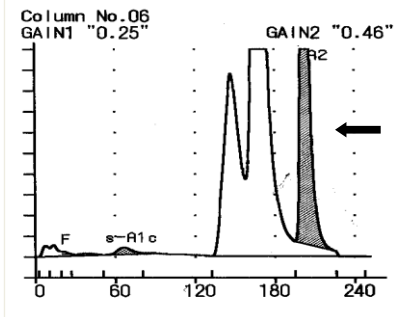
Focagem Isoelétrica



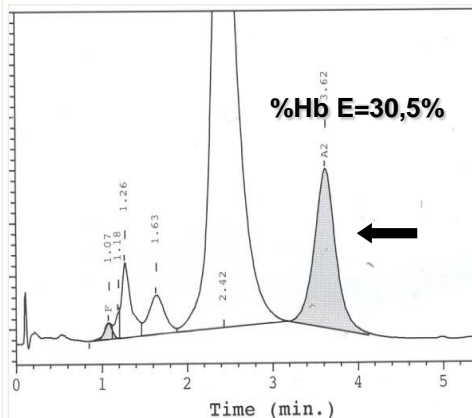
Cromatografias

HPLC – HA 8160

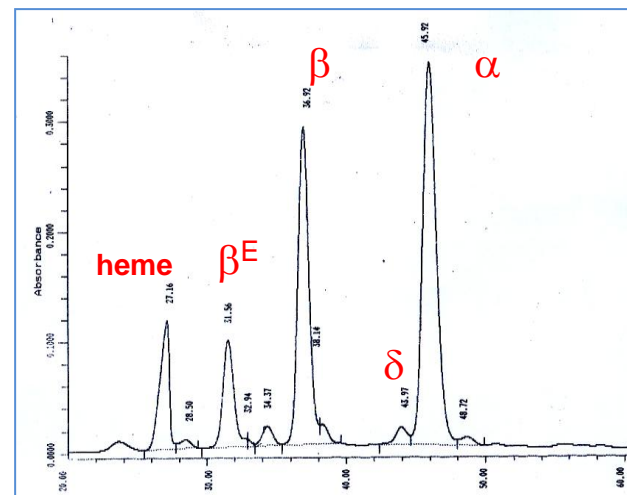
HbA1c	3 - 1 %	HbF	0 - 3 %
HbA1	5 - 1 %	HbA2	21 - 9 %
P1	Sec 8	Area 356	% 0.9
P2	14	433	1.1
P3	F 21	138	0.3
P4	L-A1c 39	345	0.9
P5	s-A1c 66	1200	3.1
P6	#A0 88	26	0.1
P7	A0 168	36353	70.9
P8	A2 202	12396	24.2
Total		51247	



HPLC – Variant II da Biorad



HPLC de Fase Reversa das cadeias de globina



Área α = 399,354
Área não α = 396,737
Variante Hb cadeia β

TRR = $\frac{tr \beta^x}{tr \beta}$
Hb E = 23,0%

Portador de Hb C

Amostra

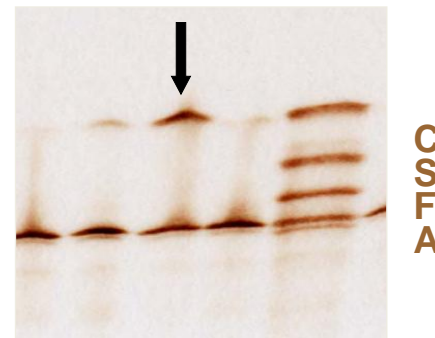
Sexo-F
Idade-32 anos

Hemograma

Hb=13,4 g/dL
G.V.= $4,16 \times 10^{12}/L$
Ht=0,399
VGM=95,8 fL
HGM=32,1 pg
CHGM=33,5 g/dL
RDW=12,9%

Focagem Isoelétrica

Hb C

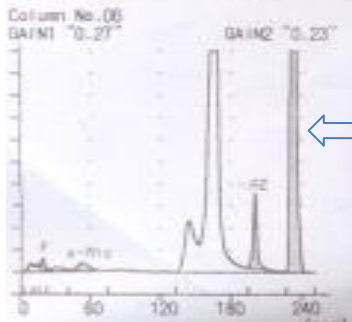


Cromatografias

HPLC – HA 8160

HbA1c	28	mol/mol	[IFCC]
HbA1c	4.7	% HbF	0.7 %
HbA1	5.4	% HbA2	3.2 %

	Sec	Area	%
F1	8	230	0.9
F2	13	171	0.7
F3 F	19	263	0.5
F4 L-A1c	31	354	1.4
F5 s-A1c	53	965	3.8
F6 A0	188	34088	49.5
F7 A2	201	1711	3.5
F8 S/C Window	231	20623	42.8
Total		48633	

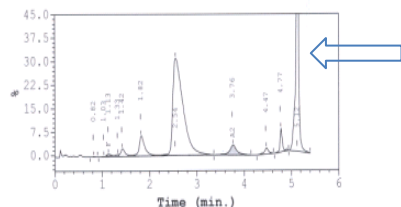


HPLC – Variant II da Biorad

F Concentration = 0.5 %
A2 Concentration = 3.2 %

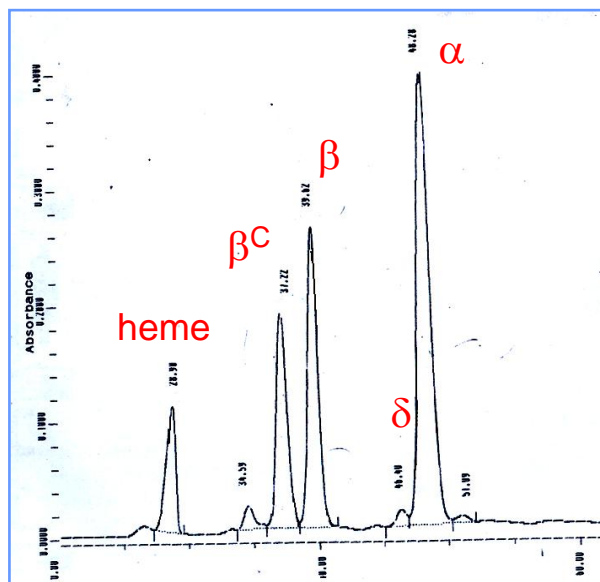
*Values outside of expected ranges

Analysis comments:



Hb C

HPLC de Fase Reversa das cadeias de globina



Área α = 447,387
Área não α = 445,037

Variante Hb cadeia β

TRR= $tr \beta^x / tr \beta$

Hb C = 40,2%

Variantes de hemoglobina raras

Hemoglobina Porto Alegre

Variante de hemoglobina rara

Descrita pela 1ª vez numa família brasileira

Tondo et al, 1963

Substituição Ser → Cys na posição 9 da cadeia β

Bonaventura et al, 1967

Polimerização no hemolizado de GV ← ligações bissulfito

Martinez G. et al, 1977

**Apresenta-se com fenótipos hematológicos normais
(heterozigotia e homozigotia)**

Hemoglobina Porto Alegre

Dados hematológicos e bioquímicos dos portadores de hemoglobina Porto Alegre (heterozigotia)

Família / Caso	1/Filha	1/Mãe	1/Avó	2/-
Data do ex. laboratorial	19/05/00	05/12/00	30/05/01	19/04/01
Sexo	F	F	F	F
Idade (anos)	13	36	-	-
G.V $\times 10^{12}/L$	4,10	4,53	4,46	4,52
Hb (g/dL)	11,1	13,9	14,0	13,4
Ht (L/L)	0,338	0,414	0,427	0,441
VGM (fL)	88,4	91,4	95,6	97,4
HGM (pg)	27,2	30,7	31,4	29,7
CHGM (%)	33,0	33,6	32,9	30,5
RDW (%)	14,0	12,0	11,6	13,8
Hb Porto Alegre (%)*	39,5	40,2	38,4	38,0
Hb Porto Alegre (%)**	15,3	17,7	16,0	20,6
Hb Porto Alegre (%)***	20,7	16,9	16,3	-

Eritrograma normal

RP-HPLC cadeias globina

HPLC-troca iônica

Eletroforese/densitometria

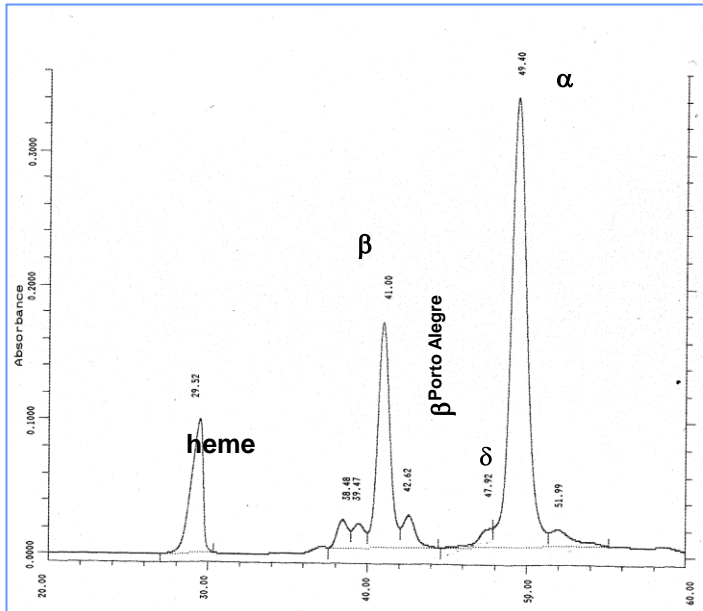
* Valores percentuais das hemoglobinas obtidos a partir das áreas dos picos dos cromatogramas obtidos por HPLC de fase reversa das cadeias de globina.

** Valores percentuais das hemoglobinas obtidos num aparelho HPLC- Hb C

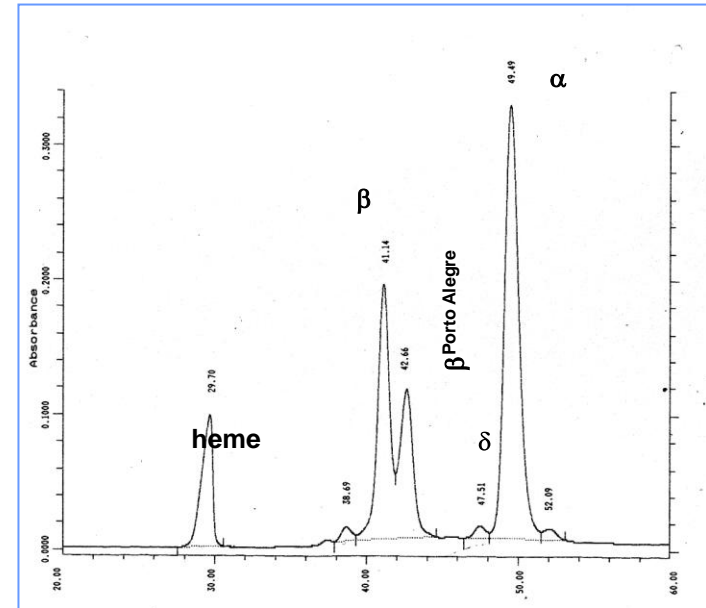
*** Valores percentuais das hemoglobinas obtidos por densitometria da electroforese em acetato de celulose, pH alcalino.

Hemoglobina Porto Alegre

Cromatogramas

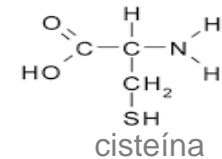


Cromatograma efetuado heterozigoto para Hb Porto Alegre. GV lavados e congelados a -20°C



Cromatograma efetuado heterozigoto para Hb Porto Alegre. GV lavados e congelados a -20°C após adição de 2-mercaptoetanol ao hemolisado a 10% (V/V)

A adição de 2-mercaptoetanol ao hemolisado repõe o pico correspondente à cadeia β Porto alegre devido provavelmente à sua ação redutora das ligações bissulfito envolvendo o grupo tiol extra na posição 9 da cadeia β



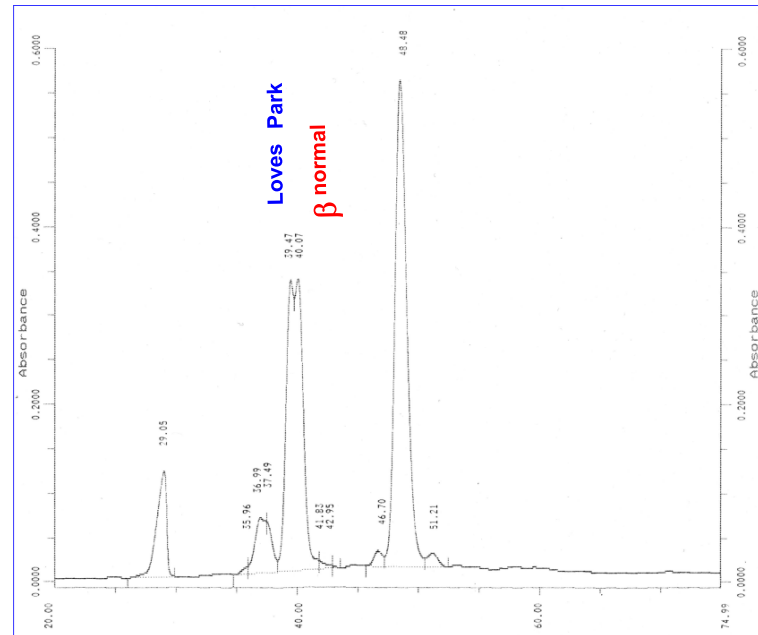
❖ A variabilidade na quantificação da Hb Porto Alegre é atribuída a fenômenos de polimerização, *in vitro*.

Variantes de hemoglobina raras e neutras

Hb Loves Park

anemia
microcítica, hipocrômica

Sexo/ idade	M/2 anos
RBC ($10^{12}/L$)	3.70
Hb (g/dL)	9.2
Hct (L/L)	0.277
MCV (fL)	74.9
MCH (pg)	24.9
MCHC (g/dL)	33.3
RDW (%)	14.1



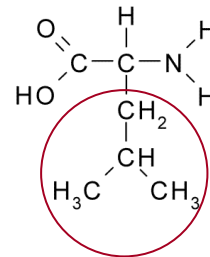
Área α = 321,221
Área não α = 310,098

Variante Hb
cadeia β
48.4%

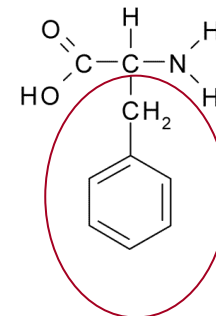
Biologia
molecular

Hb Loves Park:

Substituição na posição 68
da cadeia beta:



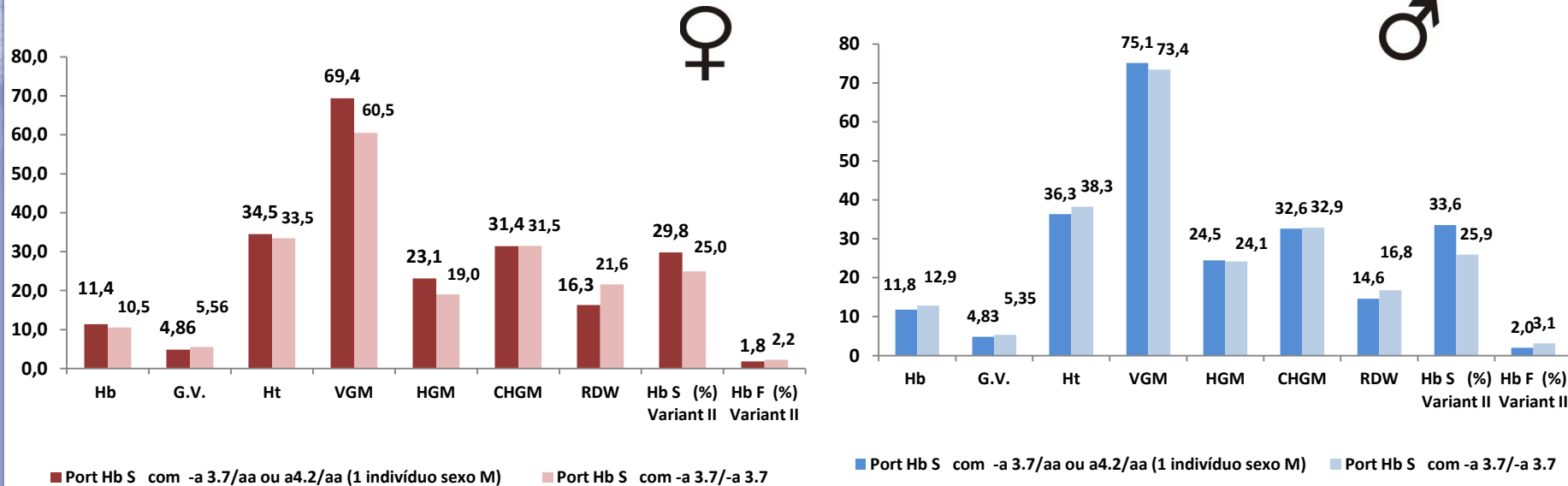
Leucina



Fenilalanina

Correlação fenótipo/ genótipo

Expressão do fenótipo hematológico de Portadores de Hb S, na presença de α talassemia deletional: $-\alpha/\alpha\alpha$; $(-\alpha/-\alpha)$



Os portadores de Hb S com homozigotia α^+ ($-\alpha^+/-\alpha^+$) relativamente aos portadores de Hb S com heterozigotia α^+ ($-\alpha^+/\alpha\alpha$), apresentam:

- ✓ diminuição do VGM (69,4- 60,5fL, no sexo F, 75,1-73,4fL, no sexo M)
- ✓ diminuição do HGM (23,1- 19,0pg, no sexo F, 24,5-24,1pg, no sexo M)
- ✓ diminuição do nível de Hb S (29,8- 25,0%, no sexo F, 33,6-25,9%, no sexo M)
- ✓ o valor médio de diminuição da percentagem de Hb S é cerca de 6%

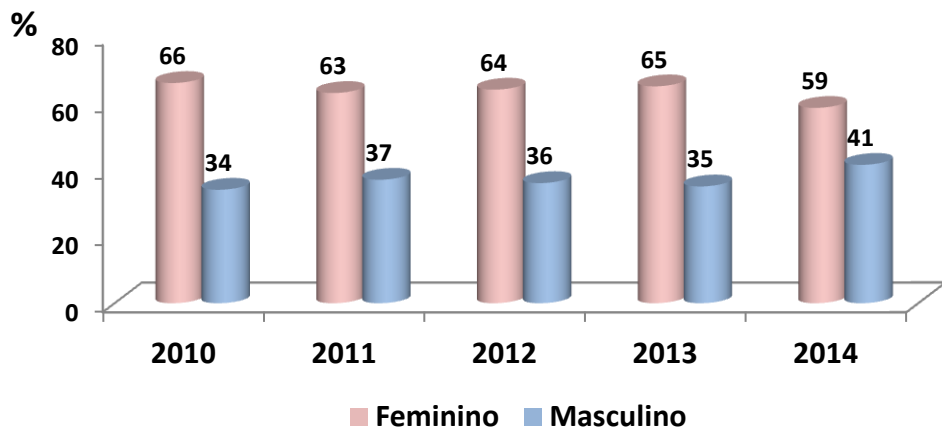
Casuística e atividade laboratorial: hemoglobinopatias 2010-2014

Entidades requisitantes:

- **Clínicos: ARSs, Hospitais, particulares**
- **Laboratórios Saúde pública (ARSs)**
- **Laboratórios privados**

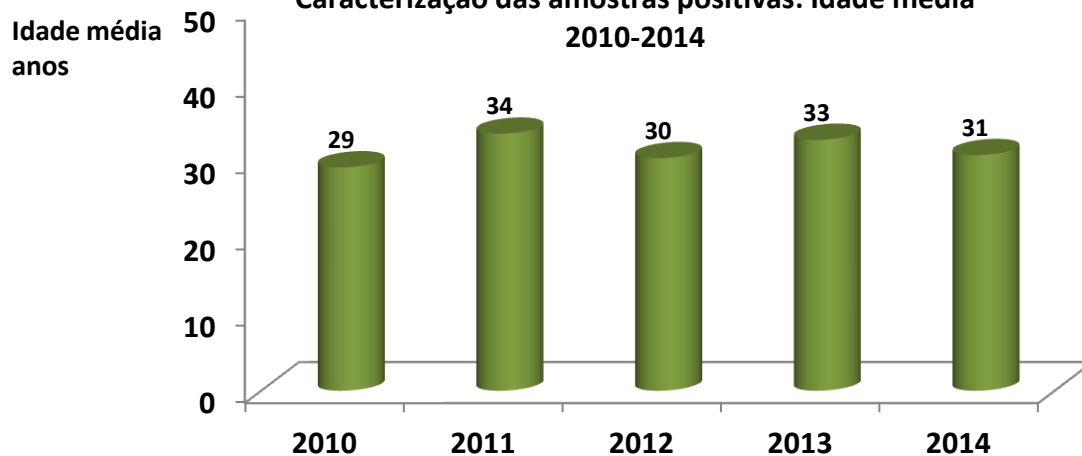
Casuística e atividade laboratorial : hemoglobinopatias 2010-2014

Caracterização das amostras positivas: Feminino -Masculino
2010-2014



➤ Os portadores são detetados com maior frequência no **sexo feminino**: **mulheres grávidas ou em idade fértil**

Caracterização das amostras positivas: Idade média
2010-2014

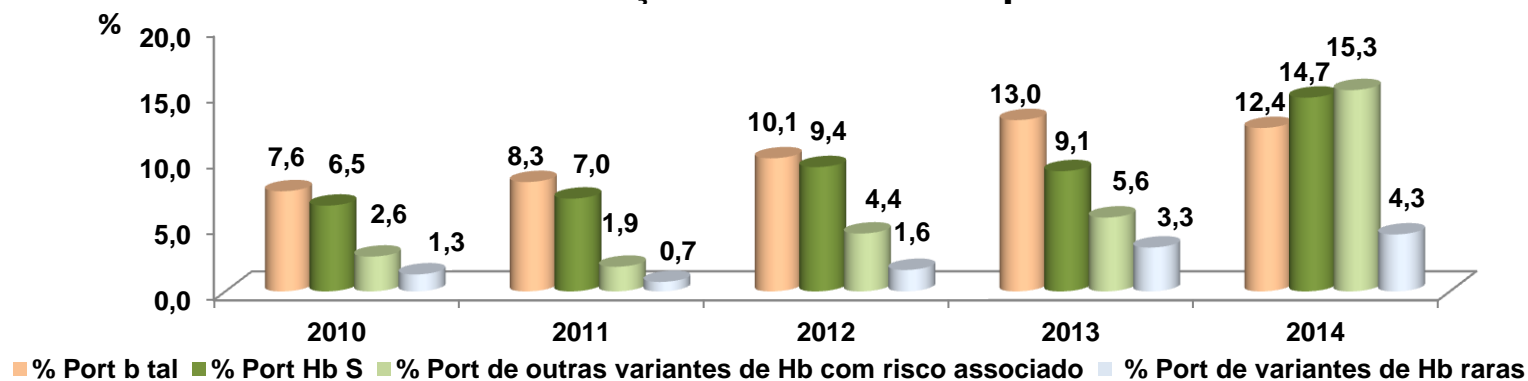


➤ A idade média de diagnóstico coincide em geral com a idade fértil

Casuística e atividade laboratorial : hemoglobinopatias 2010-2014

Ano	% Port β tal	% Port Hb S	% Port de outras variantes de Hb com risco associado	Port Hb D	Port Hb C	Port Hb E	Port Hb Lepore	Port Hb O ^{Arab}	% Port de variantes de Hb raras
2010	7,6	6,5	2,6	1,2	1,0	0,1	0,3	0,1	1,3
2011	8,3	7,0	1,9	0,5	0,5	0,1	0,7	0,1	0,7
2012	10,1	9,4	4,4	1,6	1,0	0,3	1,5	0,0	1,6
2013	13,0	9,1	5,6	1,8	2,5	0,5	0,9	0,0	3,3
2014	12,4	14,7	15,3	5,2	4,3	0,6	5,2	0,0	4,3

Caraterização das amostras positivas



❖ Portadores β -tal e HbS são os mais frequentes

Portadores β -tal-7,6-13,0%

Portadores Hb S-6,5-14,7%

❖ Percentagem significativa de outras variantes de hemoglobina:

Portadores outras variantes Hb -2,6-15,3%, Portadores variantes Hb raras -0,7- 4,3%

❖ Entre 2010 e 2014 foram estudados 11 casais em risco

Obrigada



PNAEQ

Grupo de trabalho de Hematologia

Grupo laboratório hemoglobinopatias