

FERNANDA SILVA PIMENTEL

**IDENTIFICAÇÃO DE HEMOGLOBINAS COM  
CORRIDA ELETROFORÉTICA SEMELHANTE À  
DA HEMOGLOBINA S NO PROGRAMA  
ESTADUAL DE TRIAGEM NEONATAL DE MINAS  
GERAIS (PETN-MG)**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

FACULDADE DE MEDICINA

BELO HORIZONTE

2010

FERNANDA SILVA PIMENTEL

**IDENTIFICAÇÃO DE HEMOGLOBINAS COM CORRIDA  
ELETROFORÉTICA SEMELHANTE À DA HEMOGLOBINA S NO  
PROGRAMA ESTADUAL DE TRIAGEM NEONATAL DE MINAS  
GERAIS (PETN-MG)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, Área de Concentração: Saúde da Criança e do Adolescente, como requisito para obtenção do título de Mestre.

**Orientador:** Prof. Dr. Marcos Borato Viana

Professor Titular do Departamento de Pediatria da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais

## **UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

**Reitor:** Prof. Clélio Campolina Diniz

**Pró-Reitor de Pós-Graduação:** Prof. Ricardo Santiago Gomez

**Pró-Reitor de Pesquisa:** Prof. Renato de Lima dos Santos

**Diretor da Faculdade de Medicina:** Prof. Francisco José Penna

**Coordenador do Centro de Pós-Graduação:** Prof. Manoel Otávio da Costa Rocha

**Chefe do Departamento de Pediatria:** Profa. Benigna Maria de Oliveira

### **PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE - ÁREA DE CONCENTRAÇÃO SAÚDE DA CRIANÇA E DO ADOLESCENTE**

**Coordenador:** Profa. Ana Cristina Simões e Silva

**Subcoordenador:** Prof. Eduardo Araújo Oliveira

#### **Colegiado:**

Alexandre Rodrigues Ferreira

Débora Márques de Miranda

Ana Cristina Simões e Silva

Benigna Maria de Oliveira

Eduardo Araújo de Oliveira

Sérgio Veloso Brant Pinheiro

Ivani Novato Silva

Juliana Gurgel

Jorge Andrade Pinto

Helena Maria Gonçalves Becker

Marcos José Burle de Aguiar

Roberta Maia de Castro Romanelli

Maria Cândida Ferrarez Bouzada Viana

Cláudia Regina Lindgren

Suelen Rosa de Oliveira

Izabel Vasconcelos Barros Poggiali

FERNANDA SILVA PIMENTEL

**IDENTIFICAÇÃO DE HEMOGLOBINAS COM CORRIDA  
ELETROFORÉTICA SEMELHANTE À DA HEMOGLOBINA S NO  
PROGRAMA ESTADUAL DE TRIAGEM NEONATAL DE MINAS  
GERAIS (PETN-MG)**

**BANCA EXAMINADORA**

Prof. Marcos Borato Viana

Profa. Cláudia Regina Bonini Domingos

Profa. Maria Christina Lopes Araújo Oliveira

Belo Horizonte, 31 de maio de 2010

**Dedico este trabalho**

*Aos meus pais,  
Chris,  
Tiago,  
Maria Helena,  
e especialmente a Deus.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, o maior mentor deste trabalho. Obrigada pela vida!

Aos meus pais José Maria e Maria das Almas, pelo amor incondicional. Por me ensinarem o sentido da vida e o valor de uma boa educação. Vocês são exemplos de força e fé.

A você Chris, não tenho palavras suficientes para agradecer o apoio incondicional em todos os momentos. Obrigada por me erguer nos momentos difíceis, por suportar minhas fraquezas e compreender a minha ausência. Te amo muito.

À professora e amiga Maria Helena Ferraz, idealizadora deste projeto, por acreditar na minha capacidade e me inserir no caminho científico. Sua amizade, seu apoio e seu estímulo foram essenciais na concretização deste estudo e têm sido muito importantes no meu desempenho profissional.

Ao meu orientador, professor Marcos Borato Viana, obrigada pela credibilidade, confiança e compreensão. Pela dedicação e comprometimento na realização deste trabalho. O senhor é um exemplo de competência e profissionalismo. A minha eterna admiração.

Ao Tiago, filho muito amado. Nascido algumas horas após a minha aprovação na primeira etapa do mestrado. Obrigada por esperar a hora certa de nascer. Me desculpe pela ausência. Você é a razão do meu viver.

Aos meus irmãos e cunhados obrigada pela amizade, pelas palavras de apoio e por torcerem por mim.

À minha segunda família, Sousa Borges, obrigada pelo apoio a mim dado e pelo carinho e atenção dada ao meu filho e marido nos momentos de minha ausência.

Às crianças, sujeitos desta pesquisa, e aos pais ou responsáveis, pela confiança e por tornarem possível a realização deste trabalho.

À amiga Sandra Trad pela amizade, companheirismo, disponibilidade e por ouvir os meus desabafos nos momentos difíceis. A minha eterna gratidão.

Ao Dr. José Nélio Januário, diretor Geral do Nupad, pelo apoio sem o qual este trabalho não poderia ter sido realizado.

Ao meu coordenador Roberto Vagner Puglia, coordenador do Laboratório de Triagem Neonatal do Nupad, pelo apoio constante e pela compreensão.

À Dra. Dora Mendez del Castillo, coordenadora do Laboratório de Genética e Biologia Molecular do Nupad e sua equipe, em especial a Nara, pela importante

contribuição na realização dos exames de biologia molecular e por ceder informações indispensáveis para a realização deste trabalho.

Ao “Nupad”, pelo apoio logístico da Central de Projetos. Pelo apoio da equipe do Serviço de Referência de Controle e Tratamento (SCT), da Informática e Informação, da Divulgação e Comunicação Social, do laboratório de Triagem Neonatal, da Central de Contatos, do Setor de documentação. Obrigada por contribuírem no desenvolvimento deste trabalho.

À bibliotecária Maria Piedade, pelo apoio na normatização das referências e em levantamentos bibliográficos.

Ao colega de pós-graduação André Belisário pela contribuição na realização dos exames moleculares e por ceder informações importantes relativas à PCR.

Ao Carlos Perone pelos conhecimentos e contribuição.

As colegas Nara, Marcilene, Bruna e Juliana Nunes, pelas dicas e pelo compartilhar.

As minhas tias, primas, amigas de graduação, colegas de trabalho, em especial Leandro, e todos os demais amigos e familiares que mais próximos ou mais distantes estiveram presentes nesta etapa da minha vida.

À equipe da Hematologia do Hospital das Clínicas, da Fundação Hemominas, das Unidades de Saúde (UBS) pelo apoio e auxílio.

As acadêmicas de medicina, Vanessa Cirino, Isabela Moraes e Marcela Hooper pelas incansáveis tentativas de contato com as famílias, pela organização de planilhas, localização e análise de géis; em especial, à Marcela pelo constante apoio na execução deste trabalho.

Ao acadêmico de medicina Pedro Carneiro pelo apoio na construção de planilhas.

Desde a localização das famílias até a obtenção do resultado final deste trabalho, diversos profissionais despenderam esforços necessários à concretização deste estudo. A todos vocês muito obrigada!!

## RESUMO

**Introdução:** A triagem neonatal é de suma importância para a identificação de crianças com HbS. A incidência da doença falciforme em MG é 1:1.400 recém-nascidos. Há pelo menos três hemoglobinas variantes de cadeia beta e quatro de alfa, cujos pontos isoelétricos são semelhantes ao da HbS, o que pode levar ao diagnóstico falso positivo para traço ou doença falciforme. **Objetivos:** a) diferenciar a HbS de outras variantes com propriedades semelhantes na IEF; b) sequenciar uma variante encontrada em duas crianças homozigotas c) avaliar a relevância clínica desta variante. **Métodos:** Foram estudadas 126 crianças que tiveram os resultados da triagem neonatal lidos como indeterminados. Confirmação pela IEF no sexto mês de vida mostrou uma variante com mobilidade da HbS. Foram colhidas novas amostras e os géis de IEF foram lidos em duplicata, por três observadores independentes. As variantes foram classificadas, de forma tentativa, como mais rápidas (+0,5 mm), indistinguíveis ou mais lentas (-0.5 mm) do que o controle Hb S. Foi realizada PCR alelo-específica para o gene S em todos os casos; PCR multiplex para as sete deleções da  $\alpha$ -talassemia foi realizada nas duas famílias com homozigose da Hb variante. Os genes da alfa-globina foram sequenciados em ambos os casos e o gene beta, no primeiro caso. NCBI NG\_000006.1 foi a sequência de referência para o gene  $\alpha$ . **Resultados:** 62 crianças foram inicialmente diagnosticadas pelo programa como sendo Hb AS, 62 AV e 2 VV (V = Hb "rara"). Das 756 leituras ( $126 \times 3 \times 2 = 756$ ) das IEFs, as Hbs foram classificadas como sendo mais rápidas do que a S-controle em 56,7%, mais lentas em 5,4% e indistinguíveis em 35%. A concordância intraobservador variou entre 63,2% e 77,5%. A concordância tríplice interobservador foi de apenas 23,3%. Em 12 casos (9,5%) a PCR para o gene S foi positiva; o padrão de IEF foi mais rápido em 29% de leituras e indistinguíveis de S em 71%. Não havia parentesco conhecido entre as famílias das duas crianças homozigotas. Casamento consanguíneo estava presente em ambas as famílias. A IEF mostrou em ambas as crianças uma única banda com mobilidade da Hb S. A IEF dos pais mostrou o fenótipo AS. O teste de falcização e a PCR alelo-específica para  $\beta^S$  foram negativos. O sequenciamento do gene  $\beta$  na primeira família foi normal. A PCR multiplex para as deleções da  $\alpha$ -talassemia revelou que ambas as crianças eram  $-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$  e todos os pais  $\alpha\alpha/-\alpha^{3.7}$ . O sequenciamento do gene híbrido  $\alpha^{3.7}$  revelou uma mutação no códon 78 (AAC> AAA; Asn> Lys; Hb Stanleyville-II), em homozigose para as crianças e em heterozigose para todos os pais. Foi detectada  $\alpha^{3.7}$  do tipo I no gene híbrido: o *crossing-over* ocorreu a 5' do sítio de restrição da ApaI, no IVS-2, do gene primitivo  $\alpha 1$ . Ambas as crianças tinham anemia hipocrômica e leve microcitose, como esperado para pacientes com  $-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$ . **Conclusões:** A classificação proposta para Hb S-like por IEF é inadequada. Muitas variantes "indistinguíveis" por IEF foram confirmadas como Hb não-S. Algumas Hb S verdadeiras foram lidas como mais "rápida" do que a S-controle. Contudo a Hb S verdadeira nunca foi lida como mais "lenta" e, portanto, é uma boa pista para o diagnóstico diferencial. Métodos moleculares elucidarão as variantes "raras". Duas dessas crianças, tinham homozigose para a talassemia  $-\alpha^{3.7}$  (tipo I) associada à Hb Stanleyville ( $\alpha^{78}$  Asn>Lys), no estado de homozigose ( $\alpha_2^{Sta}\beta_2$ ). Os pais foram heterozigotos para ambas as mutações. Microcitose e hipocromia refletem o quadro típico da  $\alpha$ -talassemia-1.

## ABSTRACT

**Introduction:** Newborn screening is crucial for the identification of children with HbS. The incidence of sickle cell disease in MG is 1:1,400. There are at least 3 beta and 4 alpha globin variants whose isoelectric focusing point is similar to that of HbS, which may lead to false positive diagnosis of sickle cell trait or disease. **Objectives:** a) to discriminate HbS from variants with similar IEF properties; b) to sequence a variant found in 2 homozygous children, c) to assess the clinical meaning of thos variant. **Methods:** 126 children who had newborn screening results read as indeterminate and confirmation IEF at age 6 months showing a variant with HbS mobility were studied. New samples were collected and IEF gels were independently read in duplicate by 3 observers. Variants were tentatively classified as faster (+0.5mm), indistinguishable or slower (-0.5mm) than a HbS-control. Allele-specific PCR for S-gene was done in all cases and multiplex PCR for 7  $\alpha$ -thalassemia deletions were done in homozygous cases. Alpha-globin genes were sequenced in both cases and beta-gene, in the first case. NCBI NG\_000006.1 was the reference sequence for the  $\alpha$  gene. **Results:** 62 children were originally diagnosed by the program as AS; 62 AV, and 2 VV (V="rare" Hb). From 756 readings (126x3x2=756) Hbs were classified as faster than control-S in 56.7%, slower in 5.4% and indistinguishable in 35%. The intra-observer agreements varied from 63.2-77.5%. Triple inter-observer agreement was only 23.3%. In 12 cases (9.5%) PCR S-gene was positive; blind IEF pattern was faster in 29% of readings and indistinguishable from S in 71%. Families of the two homozygous children were not related to each other. Consanguineous marriage was present in both families. IEF in both children yielded a single band with HbS mobility. Parents' IEF looks like AS phenotype. Sickle preps and  $\beta^S$  allele-specific PCR were all negative.  $\beta$ -gene sequencing in the first family was normal. Multiplex PCR for  $\alpha$ -thalassemia deletions disclosed that both children were - $\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$  and all parents  $\alpha\alpha/-\alpha^{3.7}$ . Hybrid  $\alpha^{3.7}$  gene sequencing showed mutation in codon 78 (AACC>AAA; Asn>Lys; Hb Stanleyville-II), homozygous for both children and heterozygous for all parentes. Type I  $\alpha^{3.7}$  hybrid gene was detected throughout: crossover had occurred 5' of Apa-I restriction site in IVS 2 of the primitive  $\alpha 1$ -gene. Both children had mild mycrocytic and hypochromic anemia, as expected for - $\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$  patients. **Conclusions:** The proposed IEF classification for S-like Hb is misleading. Many IEF "indistinguishable" variants were proved not being Hb S. Some true Hb S were read as "faster" than S. True Hb S, however, was never read as a "slower" Hb and thus is a good hint for the differential diagnosis. Molecular methods will elucidate the "rare" variants. In one of these both children had homozygous  $\alpha^{3.7}$  thalassemia (type I) associated with Hb Stanleyville-II ( $\alpha^{78}$  Asn $\rightarrow$ Lys), in homozygous state ( $\alpha_2^{Sta}\beta_2$ ). Parents were heterozygous for both mutations. Mycrocytosis and hypochromia represent the typical picture of  $\alpha$ -thalassemia-1.

## SUMÁRIO

RESUMO.....	viii
ABSTRACT .....	ix
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS .....	xiii
LISTA DE QUADROS E TABELAS .....	xvi
LISTA DE FIGURAS .....	xvii
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	3
2.1 A Triagem Neonatal para Hemoglobinopatias.....	3
2.1.1 Métodos Laboratoriais Aplicados à Triagem Neonatal das Hemoglobinopatias.....	5
2.1.1.1 Eletroforese por Focalização Isoelétrica (IEF).....	6
2.1.1.2 Cromatografia Líquida de Alta Resolução (HPLC).....	7
2.2 Hemoglobinopatias.....	8
2.3 Hemoglobinas Variantes.....	10
2.3.1 Hemoglobina S.....	11
2.3.2 Hemoglobinas variantes semelhantes à HbS .....	12
2.3.2.1 Hemoglobinas variantes de cadeia $\beta$ semelhantes à Hb S.....	17
2.3.2.2 Hemoglobinas variantes de cadeia $\alpha$ semelhantes à Hb S.....	18
2.4 Alfa talassemia.....	20
3. OBJETIVOS.....	23
3.1 Objetivo Geral.....	23
3.2 Objetivos Específicos.....	23
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	24
4.1 Tipo de estudo.....	24
4.2 Considerações Éticas.....	24
4.3 Financiamento.....	24
4.4 Casuística.....	24

4.5 O Programa Estadual de Triagem Neonatal para Doença Falciforme e Outras Hemoglobinopatias (PETN-MG) .....	25
4.5.1 Metodologias utilizadas no Laboratório de Hemoglobinopatias do Nupad.....	25
4.5.1.1 Princípios dos métodos utilizados no Laboratório de Hemoglobinopatias.....	26
4.5.1.1.1 Cromatografia Líquida de Alta Resolução (HPLC) – <i>Kit Variant TM Sickle Cell Short Program</i> .....	26
4.5.1.1.2 Eletroforese por Focalização Isoelétrica (IEF) <i>Hemoglobin Test Kit</i> .....	27
4.5.2 Protocolos utilizados pelo PETN-MG para a liberação dos resultados das hemoglobinopatias.....	28
4.5.2.1 Protocolo utilizado para a análise do resultado da HPLC.....	28
4.5.2.2 Protocolo utilizado para a análise do resultado da IEF.....	30
4.6 Metodologias utilizadas na pesquisa.....	31
4.6.1 Coleta das amostras.....	31
4.6.2 Realização da Eletroforese por Focalização Isoelétrica (IEF).....	32
4.6.3 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) alelo-específica para a detecção da mutação que origina a Hb S (códon 6 do éxon 1, <u>G</u> <u>A</u> <u>G</u> > <u>G</u> <u>T</u> <u>G</u> ).....	33
4.6.4 Realização da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para o diagnóstico molecular de alfa-talassemia .....	34
4.6.5 Sequenciamento dos genes da beta e alfa globina nas famílias de duas crianças homozigóticas para hemoglobina variante detectada por IEF.....	36
4.6.6 Realização de exames complementares para uma das crianças com variante em homozigose (Id 62).....	37
4.6.7 Análise dos resultados da Cromatografia de Alta Resolução (HPLC) nas amostras dos recém-nascidos com hemoglobinas variantes.....	38
4.6.8 Metodologia de apresentação dos resultados.....	38
5. RESULTADOS.....	39
5.1 Distribuição geográfica, em Minas Gerais, das 126 crianças participantes da pesquisa .....	39
5.2 Eletroforese por Focalização Isoelétrica (IEF).....	40
5.3 Análise dos resultados da Cromatografia Líquida de Alta resolução (HPLC)	

das amostras dos recém-nascidos com hemoglobinas variantes.....	42
5.4 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) alelo-específica para a detecção da mutação que origina a Hb S.....	42
5.4.1 Estudo das doze crianças com PCR positiva para a mutação S.....	43
5.4.1.1 Leitura dos géis de IEF das doze crianças com PCR positiva para a mutação S.....	46
5.5 Estudo das duas crianças nas quais a hemoglobina variante encontrava-se em homozigose.....	47
5.5.1 Dados epidemiológicos.....	47
5.5.2 Eletroforese por Focalização Isoelétrica (IEF).....	47
5.5.3 Análise dos resultados da Cromatografia de Alta Resolução (HPLC) nas amostras dos recém-nascidos.....	48
5.5.4 Realização da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para o diagnóstico molecular da alfa-talassemia.....	49
5.5.5 Sequenciamento dos genes da beta e da alfa globina.....	50
5.5.6 Exames complementares .....	53
5.6 Resultados finais das crianças portadoras de hemoglobina variante na região da Hb S.....	54
6. DISCUSSÃO.....	55
6.1 Casuística e distribuição geográfica das crianças participantes do estudo.....	55
6.2 Achados cromatográficos e eletroforéticos.....	56
6.3.Hb Stanleyville II.....	58
6.4 Hb Stanleyville II em associação com a deleção $-\alpha^{3,7}$ .....	62
6.5 Contribuição para o aprimoramento do protocolo de liberação dos resultados de hemoglobinopatias pelo PETN-MG.....	64
7. CONCLUSÕES.....	66
8. REFERÊNCIAS.....	68
9. ANEXOS.....	74

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

# – número

AFSC – Padrão para controle de eletroforese de hemoglobina, contendo mistura de hemoglobinas A, F, S e C, nesta ordem

Ala – Alanina

Arg – Arginina

Asp – Aspartato

Asn – Asparagina

BLAST – Basic Local Alignment Search Tool

bp – *base pairs*, pares de bases

C<sup>+</sup> – Controle positivo

C<sup>-</sup> – Controle negativo

CHCM – Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média

COEP – Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG

DNA – *Deoxyribonucleic acid* – Ácido desoxirribonucleico

dNTP – *deoxynucleotide triphosphate* – desorribonucleotídeo trifosfatado

DEPE – Diretoria de Ensino, Pesquisa e Extensão do Hospital das Clínicas da UFMG

EDTA – *Ethylenediamine tetracetic acid* – Ácido etilendiamino tetra-acético

EUA – Estados Unidos da América

FH – *Primer* cedido pela Fundação Hemominas (FH)

Glu – Ácido glutâmico

Gly – Glicina

Hb – Hemoglobina

Hb A – Hemoglobina A

Hb A<sub>2</sub> – Hemoglobina A<sub>2</sub>

Hb AC – Genótipo heterozigoto para hemoglobina C

Hb AD – Genótipo heterozigoto para hemoglobina D

Hb AS – Genótipo heterozigoto para hemoglobina S

Hb C – Hemoglobina C

Hb D – Hemoglobina D

Hb E – Hemoglobina E

Hb H – Hemoglobina H (tetrâmero β<sub>4</sub>)

Hb S – Hemoglobina S

Hb SC – Genótipo duplo heterozigoto para hemoglobina S e C  
Hb SS – Genótipo homozigoto para hemoglobina S  
Hbs – Hemoglobinas  
HCM – Hemoglobina Corpuscular Média  
HEMOMINAS – Fundação Centro de Hematologia e Hemoterapia de Minas Gerais  
HPLC – *High Performance Liquid Chromatography* – Cromatografia Líquida de Alta Resolução  
Ht – Hematócrito  
Id – Identificação  
IEF – *Isoelectric focusing* – Eletroforese por Focalização Isoelétrica  
ind – Indeterminada  
IVS – *Intervening sequence* – íntron  
Leu – Leucina  
LF – Lago de Furnas  
LIS – gene que codifica o *platelet-activating factor acetylhydrolase, isoform Ib*, localizado no cromossoma 17  
Lys – Lisina  
MG – Minas Gerais  
n – número de amostras  
NCBI – *National Center for Biotechnology Information*  
Nupad – Núcleo de Ações e Pesquisa em Apoio Diagnóstico  
OMS – Organização Mundial de Saúde  
OP – Ouro Preto  
PCR – *Polymerase Chain Reaction* (Reação em cadeia da polimerase)  
FA – Perfil de hemoglobina FA  
FAD – Perfil de hemoglobina FAD  
FAE – Perfil de hemoglobina FAE  
FAS – Perfil de hemoglobina FAS  
PETN-MG – Programa Estadual de Triagem Neonatal de Minas Gerais  
pH – Potencial hidrogeniônico  
pI – Ponto isoelétrico  
PNTN – Programa Nacional de Triagem Neonatal  
RBC – *Red blood cells* (hemácias)  
RFLP – Polimorfismos de comprimento de fragmentos de restrição

RNA – Ácido ribonucleico

rpm – rotações por minuto

Ser – Serina

SRTN – Serviço de Referência em Triagem Neonatal

TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

UBS – Unidade Básica de Saúde

UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais

USA – *United States of America* (Estados Unidos da América)

v – Versão

Val – Valina

VCM – Volume corpuscular médio

VDMS – programa utilizado para análise do HPLC no Laboratório do Nupad

## LISTA DE QUADROS E TABELAS

QUADRO 1 – Conduas adotadas pelo PETN-MG após a liberação de alguns diagnósticos laboratoriais.....	31
QUADRO 2 – Sequência de oligonucleotídeos para cada tipo de deleção da $\alpha$ -talassemia, respectivas concentrações utilizadas nas reações de PCR, e tamanho esperados dos amplicons.....	35
QUADRO 3 – Iniciadores do processo de sequenciamento do gene híbrido $-\alpha^{3.7}$ em homozigose, nos recém-nascidos que continham uma hemoglobina variante desconhecida.....	37
TABELA 4 – Motivos pelos quais não foi possível a participação de 167 crianças na pesquisa.....	39
TABELA 5 – Classificação da mobilidade eletroforética das hemoglobinas variantes na região da Hb S, de acordo com a leitura da IEF realizada por três observadores independentes.....	41
QUADRO 6 – Análise dos 12 casos nos quais a PCR para a mutação correspondente à Hb S foi positiva.....	45
TABELA 7 – Dados hematológicos das duas famílias com Hb Stanleyville-II.....	53
TABELA 8 – Resultados liberados pelo PETN-MG e resultados encontrados na pesquisa das 126 crianças estudadas.....	54

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Esquema da localização de algumas hemoglobinas variantes de cadeia $\alpha$ e $\beta$ , por focalização isoelétrica em gel de poliacrilamida.....	15
FIGURA 2 – Esquema da localização de algumas hemoglobinas variantes de cadeia $\alpha$ e $\beta$ , por focalização isoelétrica em gel de agarose.....	16
FIGURA 3 – Mutações deletórias mais comuns causadoras da $\alpha$ -talassemia.....	21
FIGURA 4 – Foto do <i>Variant TM</i> utilizado em HPLC, <i>Kit Sickle Cell Short Program</i> .....	27
FIGURA 5 – Cuba eletroforética de IEF contendo um gel com a corrida eletroforética já processada.....	28
FIGURA 6 – Ilustração do <i>cluster</i> do gene alfa, extensão das deleções e posição dos oligonucleotídeos.....	36
FIGURA 7 – Mapa do estado de Minas Gerais. Em destaque, as cidades onde houve pelo menos quatro casos de crianças portadoras de hemoglobina variante com corrida eletroforética na posição da Hb S.....	40
FIGURA 8 – Visão parcial de gel de IEF contendo Hb variante ligeiramente mais lenta que a Hb S controle.....	41
FIGURA 9 – PCR para detecção do alelo S em crianças triadas no PETN-MG.....	43
FIGURA 10 – Cromatograma obtido pelo equipamento Variant (HPLC) da amostra de recém-nascidos id # 40.....	46
FIGURA 11 – Visão parcial de gel de IEF . Corrida eletroforética da amostra ao nascimento e do 6º mês de vida da criança LF e seus pais.....	48
FIGURA 12 – Visão parcial da tela de resultado da HPLC. Resultado da cromatografia registrada no sistema do Nupad da criança OP.....	49
FIGURA 13 – PCR <i>multiplex</i> para detecção de deleções do gene da alfa globina. Gel de agarose a 1% contendo brometo de etídio mostrando padrões genotípicos para o gene da globina.....	50
FIGURA 14 – Eletroferograma correspondente ao sequenciamento do gene híbrido $-\alpha^{3.7}$ da criança OP mostrando a mutação AAC>AAA, no códon 78, caracterizando a Hb Stanleyville-II em homozigose.....	51

FIGURA 15 – Eletroferogramas correspondentes ao sequenciamento do gene híbrido $\alpha^{3.7}$ mostrando a mutação em heterozigose.....	52
FIGURA 16 – Sequência nucleotídica do segundo íntron (IVS-2) dos genes $\alpha 2$ (em vermelho) e $\alpha 1$ (em preto) para ressaltar as diferenças entre elas.....	53

### 1. INTRODUÇÃO

Os programas de triagem neonatal, “teste do pezinho”, exercem um importante papel na identificação e caracterização das hemoglobinopatias, possibilitando, além do diagnóstico, o tratamento e o acompanhamento das crianças por elas acometidas.

A triagem neonatal para hemoglobinopatias tem como principal objetivo a redução da morbidade e mortalidade de crianças acometidas com a Doença Falciforme (EMBURY *et al.*, 1994).

A hemoglobina S é a variante mais comum na população brasileira. O gene da hemoglobina S (Hb S) teve origem no continente africano e sua introdução no Brasil se deu principalmente com a entrada de escravos, durante o regime escravocrata (ZAGO *et al.*, 1983). Na forma de homozigose (Hb SS), também chamada anemia falciforme, em interação com outras hemoglobinas variantes, ou ainda, em interação com as talassemias, coletivamente conhecidas como Doença Falciforme, ela apresenta elevada morbidade e mortalidade, necessitando de tratamento precoce (FERRAZ; MURAO, 2007).

No estado de Minas Gerais, modelo no Brasil em relação ao diagnóstico precoce das doenças falciformes, a introdução do programa de triagem neonatal das hemoglobinopatias ocorreu em março de 1998. Esse programa é coordenado pelo Núcleo de Ações e Pesquisa em Apoio Diagnóstico (Nupad), da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), que encaminha os recém-nascidos diagnosticados com doença falciforme para acompanhamento multidisciplinar na Fundação Hemominas.

Segundo os dados do Programa Estadual de Triagem Neonatal de Minas Gerais (PETN-MG), em mais de um milhão de crianças triadas, a incidência do traço falciforme (Hb AS) foi de 3,3% e a incidência da doença falciforme foi de 1:1.400 recém-nascidos triados (JANUÁRIO, 2002).

Há na literatura várias hemoglobinas variantes com comportamento eletroforético e/ou cromatográfico semelhante ao da Hb S (HOCKING, 1997; VIPRAKASIT *et al.*, 2002; SANCHAISURIYA *et al.*, 2004; CHINELATO-FERNANDES; BONINI-DOMINGOS, 2005; FUCHAROEN *et al.*, 2007; BEZERRA *et al.*, 2009), o que pode levar a um diagnóstico falso-positivo para Hb S.

No período de 03/1998 a 06/2008, o PETN-MG realizou o teste de triagem para doença falciforme e outras hemoglobinopatias em 2.752.731 crianças, tendo sido detectados 1.637 casos cujos resultados, aparentemente, representavam hemoglobinas variantes não identificadas pelos métodos utilizados – Cromatografia Líquida de Alta Resolução (HPLC) e Eletroforese por Focalização Isoelétrica (IEF). Tomou-se então a decisão de liberar os resultados como hemoglobinas variantes indeterminadas (“Ind”) e foram solicitadas novas coletas no sexto mês de vida para elucidação do diagnóstico, de acordo com as normas do Laboratório de Hemoglobinopatias do PETN-MG.

Dos resultados ditos “Ind”, a análise das hemoglobinas pela focalização isoeletrica, realizada em amostra do 6º mês de vida da criança, demonstrou que 139 casos apresentavam resultado compatível com Hb AS e 154 casos apresentavam uma hemoglobina com perfil eletroforético semelhante ao da hemoglobina S, sendo estes últimos liberados como Hb “Rara”. Como na maioria destes casos a hemoglobina S não foi identificada na primeira amostra, pelos métodos de IEF e/ou HPLC, suspeitou-se tratar de hemoglobina(s) rara(s), com corrida eletroforética na região da hemoglobina S. Notou-se, ainda, que havia certa concentração geográfica desses casos na região de Ouro Preto. Além disso, duas crianças triadas apresentavam resultado compatível com o estado de homozigose para variante “indeterminada”.

Considerando que algumas hemoglobinas variantes possuem comportamento eletroforético de difícil distinção da Hb S pelos métodos rotineiramente utilizados no PETN-MG e que a obtenção de um diagnóstico correto é de suma importância para se evitarem falsos diagnósticos, em especial da doença falciforme, este estudo tem como objetivo realizar a diferenciação diagnóstica entre a hemoglobina S e outras variantes indeterminadas com perfil eletroforético semelhante ao da Hb S.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 A Triagem Neonatal para Hemoglobinopatias

O primeiro programa estadual de triagem neonatal para hemoglobinopatias iniciou-se em 1975 em Nova York, sendo totalmente implantado em 1978 (EMBURY *et al.*, 1994). Inicialmente os programas de triagem utilizavam amostras de sangue fresco coletadas de cordão umbilical ao nascimento que eram analisadas pela técnica de eletroforese em acetato de celulose associada à eletroforese em gel de ágar. Posteriormente, verificou-se que hemolisados preparados de amostras de sangue colhido em papel filtro, que já eram utilizados para a triagem das doenças metabólicas, poderiam ser empregados, de forma satisfatória, para a triagem das hemoglobinopatias. Em 1990 a grande maioria dos programas já utiliza o sangue seco em papel filtro para a análise das hemoglobinas (EMBURY *et al.*, 1994).

As técnicas eletroforéticas inicialmente utilizadas passaram a ser substituídas pela focalização isoeletrica (IEF), associada, ou não, com HPLC (EMBURY *et al.*, 1994).

A triagem neonatal para hemoglobinopatias tem como principal objetivo a detecção das crianças acometidas com a Doença Falciforme. Apesar de possibilitar a detecção de outras hemoglobinopatias e de alguns tipos de talassemias, ainda não há diretrizes bem estabelecidas para essas alterações (EMBURY *et al.*, 1994).

Os primeiros programas de triagem neonatal para a doença falciforme no Brasil surgiram na década de 1990 (SERJEANT, 2000). Em junho de 2001, o Ministério da Saúde brasileiro, através da portaria nº 822/01, efetivou a inclusão da triagem para hemoglobinopatias no Programa Nacional de Triagem Neonatal (PNTN), antes limitado à investigação da fenilcetonúria e do hipotireoidismo congênito (RAMALHO *et al.*, 2003).

No Brasil, o Programa Nacional de Triagem Neonatal (PNTN) é caracterizado por quatro fases de implantação:

Fase I - Referente aos estados que realizam a triagem para fenilcetonúria e hipotireoidismo congênito;

Fase II - Referente aos estados que, além das duas primeiras triagens, realizam também a triagem para a Doença Falciforme e outras hemoglobinopatias;

Fase III – Contemplam, além dos testes previstos nas fases anteriores, a triagem para a fibrose cística.

Fase IV - Inclusão da triagem neonatal para hiperplasia adrenal congênita e deficiência de biotinidase. A Fase IV de habilitação compreende a realização de procedimentos em triagem neonatal para fenilcetonúria, hipotireoidismo congênito, doença falciforme e outras hemoglobinopatias, fibrose cística, hiperplasia adrenal congênita e deficiência de biotinidase.

Dentre as doenças detectadas e tratadas pelo PNTN, as hemoglobinopatias, e em especial a anemia falciforme, destacam-se pela alta prevalência e pelo potencial de morbimortalidade, que pode ser consideravelmente reduzidas quando se iniciam precocemente ações profiláticas para as complicações da doença (DINIZ *et al.*, 2009).

Atualmente, apenas um estado brasileiro encontra-se na Fase I do PNTN, já os demais, encontram-se habilitados para as Fases II, III ou IV do Programa (<http://portal.saude.gov.br/portal/saude>).

Apesar do principal objetivo dos programas de triagem neonatal para hemoglobinopatias estar centralizado na detecção de recém-nascidos com doença falciforme, os métodos laboratoriais utilizados na triagem permitem detectar os portadores do traço, que constituem uma parcela significativa da população (MURAO; FERRAZ, 2007).

O Estado de Minas Gerais, foi pioneiro no Brasil a implantar a triagem neonatal para doença falciforme e outras hemoglobinopatias, com o início do programa em março de 1998, sendo considerado por Serjeant (2000) estado modelo.

O Núcleo de Ações e Pesquisa em Apoio Diagnóstico-Nupad, órgão complementar da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, criado em 1993, é o serviço credenciado pelo Ministério da Saúde como Serviço de Referência em Triagem Neonatal/Acompanhamento e Tratamento das Doenças Congênitas (SRTN) do estado. Foi implantado inicialmente visando à identificação do hipotireoidismo congênito e a fenilcetonúria. Em 1998 implantou a triagem para hemoglobinopatias e, em julho de 2003, incorporou a triagem para fibrose cística.

Para a realização dos testes, o PETN-MG, realiza a coleta de amostras de sangue em papel filtro em postos de coletas, localizados principalmente nas Unidades Básicas de Saúde, de 853 municípios no estado.

As crianças com resultado positivo para a doença falciforme ou outras hemoglobinopatias são encaminhadas para acompanhamento médico a um dos centros

regionais da Fundação Hemominas, cabendo ao Nupad/SRTN a responsabilidade pelo controle e acompanhamento dos casos. O PETN-MG oferece aos pais das crianças positivas para hemoglobinopatias a realização do estudo familiar, de forma a complementar a avaliação do diagnóstico.

### **2.1.1 Métodos Laboratoriais aplicados à Triagem Neonatal das Hemoglobinopatias**

Em geral, os programas para a triagem das hemoglobinopatias no Brasil, em especial a triagem neonatal, utilizam a eletroforese de hemoglobina ou a cromatografia líquida de alta resolução (HPLC- *High Performance Liquid Chromatography*), de troca iônica, como os principais métodos para a identificação e diagnóstico laboratorial das hemoglobinopatias.

Os procedimentos eletroforéticos são bastante utilizados nas análises de hemoglobinas por serem capazes de separar todas as hemoglobinas normais e parte das hemoglobinas variantes (MELO *et al.*, 2008).

A principal forma de detecção das hemoglobinas é feita a partir de diferenças na carga elétrica das diversas variantes, em função da troca de aminoácidos ocorrida. (HOCKING, 1997; KIMURA *et al.*, 2008). No entanto, nem todas as variantes podem ser detectadas por meio deste princípio. Mutações “silenciosas” podem resultar em trocas que acarretam pequena ou nenhuma diferença de carga elétrica, devido a substituições de aminoácidos neutros, o que dificulta ou impossibilita a detecção dessas variantes (HOCKING, 1997).

A cromatografia (HPLC) e a IEF são os métodos de escolha do PETN-MG, para a triagem neonatal das hemoglobinopatias e, em especial, da doença falciforme. Estes métodos apresentam elevada sensibilidade e especificidade (CAMPBELL *et al.*, 1999; OU; ROGNERUD, 2001), ambas superiores a 99,9%, para o diagnóstico neonatal das hemoglobinas variantes de maior frequência e importância clínica: Hb S, Hb C, Hb D e Hb E. No entanto outras variantes menos comuns podem ser detectadas por estes métodos, especialmente pela IEF.

Apesar da elevada sensibilidade e especificidade destes métodos, alguns fatores podem interferir nos resultados, tais como a prematuridade extrema, transfusão sanguínea anterior à coleta de sangue, troca de amostras (FERRAZ; MURAO, 2007) e

falta de qualificação da equipe técnica para análise dos resultados. O ideal seria que todo laboratório de triagem trabalhasse com os dois métodos, sendo um de uso rotineiro e o outro para complementação nos casos duvidosos. É recomendável que todos os casos que apresentem padrão hemoglobínico inconclusivo ou duvidoso pela técnica inicialmente utilizada sejam avaliados pelo outro método, de forma a aumentar a sensibilidade e a especificidade dos resultados da triagem (FERRAZ; MURAO, 2007).

A HPLC pode apresentar limitações na identificação das hemoglobinas D (não-Punjab) e da hemoglobina E (CAMPBELL *et al.*, 1999). Diante disso, a associação deste método com a IEF é importante devido a uma maior especificidade da IEF na identificação dessas variantes (FERRAZ; MURAO, 2007).

#### **2.1.1.1 Eletroforese por Focalização Isoelétrica (IEF)**

A IEF, sistema eletroforético baseado em gradientes de pH específicos, foi desenvolvida por Olaf Vesterberg em 1964 (HOCKING, 1997).

A IEF é considerada um método eficiente para a detecção tanto das hemoglobinas normais como das hemoglobinas variantes, além de possibilitar a distinção de homozigotos e heterozigotos (DAUT *et al.*, 2002) e a identificação de frações em baixa concentração, como por exemplo a Hb A<sub>2</sub> (BERTHOLO; MOREIRA, 2006). É um método que possui alto poder de resolução e nítida separação de bandas, sendo capaz de diferenciar fenótipos de hemoglobinas na dependência do ponto isoelétrico (pI) de cada fração, em um gradiente de pH estável, o que a torna específica. É uma técnica relativamente simples, rápida e de custo-benefício favorável quando utilizada em larga escala (PAIXÃO *et al.*, 2001; KLEMAN *et al.*, 1989).

Apesar da elevada sensibilidade e especificidade do método na identificação da hemoglobina S, a ocorrência de sobreposição de bandas não é desprezível. Algumas variantes, como por exemplo, Hb G Galveston, Hb G Norfolk e Hb Stanleyville-II, podem apresentar a mesma posição da Hb S na corrida eletroforética (BASSET *et al.*, 1978).

O PETN de Minas Gerais trabalha com a focalização isoelétrica *Wallac Resolve Systems*® (Ohio, EUA), *Resolve Neonatal Hemoglobin Screen Kit* (Perkin Elmer Life and Analytical Sciences, Finland) e foi o pioneiro no Brasil a utilizar a IEF como método de triagem neonatal em larga escala (PERKIN ELMER, 2003). Paixão *et al.*

(2001) confirmaram a confiabilidade do método em distinguir traços para as hemoglobinas S, C e D de outras variantes, e da combinação com a beta talassemia.

### 2.1.1.2 Cromatografia Líquida de Alta Resolução (HPLC)

O método de HPLC, por troca catiônica, para identificação de hemoglobinas, foi desenvolvido por volta do ano de 1980 com o estabelecimento de um procedimento para a separação de inúmeras variantes através de uma coluna cromatográfica (HUISMAN, 1989).

O PETN-MG utiliza o método de HPLC, com o sistema automatizado *Variant (BioRad)*, *kit Sickle Cell Disease*, específico para a identificação de hemoglobinas na triagem neonatal, a partir de sangue em papel filtro. É considerada uma técnica altamente sensível capaz de detectar pequenas concentrações de frações hemoglobínicas (MELO *et al.*, 2008; BIO- RAD LABORATORIES, 2005), mesmo na presença de grandes concentrações da hemoglobina fetal. Por ser um sistema automatizado, há um processamento rápido das amostras com um alto índice de reprodutibilidade e exatidão (ARAÚJO *et al.*, 2004). No entanto, como o método não se propõe à detecção e identificação de outras variantes incomuns, existe a possibilidade de falhas no diagnóstico neonatal.

Algumas variantes incomuns podem apresentar perfil cromatográfico muito semelhante (mesma janela de eluição), sendo aconselhável a utilização de outro método complementar para a definição do diagnóstico (COLAH *et al.*, 2007).

É necessária precaução na interpretação das hemoglobinas D e E, detectado por HPLC, uma vez que outras variantes podem ser observadas nessas janelas. Por exemplo, as hemoglobinas D-Iran, Korle Bu, dentre outras podem eluir dentro ou próxima à janela da Hb E. As Hbs G-Philadelphia, G-Norfolk, Matsue-Oki, Winnipeg, Stanleyville-II e algumas variantes de cadeia gama podem superpor-se na janela da Hb D (CAMPBELL, 1999).

## 2.2 Hemoglobinopatias

A molécula de hemoglobina humana é uma proteína formada por um tetrâmero de dois pares de cadeias polipeptídicas, duas cadeias alfas ( $\alpha$ ) e duas cadeias não- $\alpha$  ( $\beta$ ,  $\gamma$  ou  $\delta$ ), dobradas em torno de quatro grupos hemes que são constituídos por protoporfirina IX e ferro, onde se liga o oxigênio. Os genes que sintetizam as cadeias  $\alpha$ -like estão localizados em *cluster*, no braço curto do cromossomo 16 ( $\zeta$ ,  $\alpha_2$  e  $\alpha_1$ , no sentido 5'-3'). Eles sintetizam as cadeias zeta e alfa, ambas formadas por 141 aminoácidos, mas com apenas 58% de homologia. As cadeias codificadas pelos genes  $\alpha_2$  e  $\alpha_1$  são absolutamente iguais. Os genes das cadeias não- $\alpha$  estão localizados em um *cluster* no braço curto do cromossomo 11 e regulam a síntese das cadeias épsilon, gama, delta e beta ( $\epsilon$ ,  $^G\gamma$ ,  $^A\gamma$ ,  $\delta$  e  $\beta$ , no sentido 5'-3'), todas formadas por 146 aminoácidos, com diferentes graus de homologia. Todos os genes da globina são compostos por três éxons e dois íntrons. Curiosamente, os genes se dispõem, no sentido 5'-3', na mesma ordem em que são expressos durante o desenvolvimento humano, em ambos os cromossomos (WEATHERALL; CLEGG, 2001).

A estrutura da hemoglobina humana sofre mudanças na fase embrionária, fetal e adulta, dependendo dos genes expressos em cada uma dessas fases. Durante a fase embrionária são produzidas as hemoglobinas Gower 1 ( $\zeta_2\epsilon_2$ ), Gower 2 ( $\alpha_2\epsilon_2$ ) e Portland ( $\zeta_2\gamma_2$ ) (WEATHERALL; CLEGG, 2001). Após o terceiro mês do desenvolvimento fetal, ocorre uma diminuição significativa destas hemoglobinas e sua substituição pelas hemoglobinas fetal (Hb F- $\alpha_2\gamma_2$ ), hemoglobina A (HbA- $\alpha_2\beta_2$ ) e hemoglobina A<sub>2</sub> ( $\alpha_2\delta_2$ ), sendo a Hb fetal a hemoglobina predominante nesta fase. A partir do nascimento, a síntese da cadeia  $\gamma$  diminui progressivamente, sendo que, na vida adulta, a principal hemoglobina é a do tipo A ( $\alpha_2\beta_2$ ) que, em geral, representa 96% a 99% do total da hemoglobina de um adulto normal. A hemoglobina do tipo A<sub>2</sub> ( $\alpha_2\delta_2$ ) totaliza 1 a 3% do restante e a Hb F passa a representar, então, menos de 1% da hemoglobina total produzida (Weatherall & Clegg, 2001). Em indivíduos normais a quantidade de cada hemoglobina sofrerá variação de acordo com a idade, fatores genéticos e haplótipo do cromossomo codificante de cada cadeia (WEATHERALL; CLEGG, 2001; FRENETTE; ATWEH, 2007).

Os distúrbios das hemoglobinas, ou hemoglobinopatias, constituem as doenças hereditárias monogênicas, autossômicas e recessivas, mais comuns nos seres humanos e

resultam de mutações nos complexos gênicos (*clusters*) das cadeias de globinas (WENNING *et al.*, 2000). Uma simples troca de um nucleotídeo pode levar à substituição de um aminoácido e afetar a estabilidade e/ou solubilidade da molécula ou modificar suas propriedades funcionais, causando anemias hemolíticas, ou então, alterar a afinidade pelo oxigênio. Variantes alongadas ou instáveis podem resultar em fenótipos talassêmicos. Embora a maior parte das alterações atinja o gene  $\beta$ , as alterações das cadeias  $\alpha$ ,  $\gamma$  e  $\delta$  também são comuns (KIMURA *et al.*, 2008).

As hemoglobinopatias se dividem, fundamentalmente, em dois grupos principais: as estruturais, em que a alteração na estrutura da hemoglobina se dá pela substituição de um ou mais aminoácidos em uma de suas cadeias polipeptídicas e as hemoglobinopatias por deficiências de síntese, ou talassemias, em que ocorre desequilíbrio na produção de cadeias alfa ou beta da globina (WEATHERALL; CLEGG, 2001; SONATI; COSTA, 2008).

As hemoglobinopatias apresentam prevalência significativa em todo o mundo (ARAÚJO *et al.*, 2004). Estima-se que cerca de 7% da população mundial seja portadora de genes para tais distúrbios e que 300.000 a 500.000 crianças com formas graves nascem a cada ano (WEATHERALL, 2008).

Devido à diversidade genética e prevalência, as hemoglobinopatias representam um problema de saúde pública, particularmente no Mediterrâneo, no Oriente Médio e em algumas partes da Índia, África e Sudeste da Ásia. O alto grau de miscigenação racial na população brasileira, originária de índios, africanos, descendentes europeus e asiáticos, produziu uma elevada frequência de alterações da hemoglobina, que refletem a diversidade da origem étnica existente em cada região do país (NAOUM, 1997; WENNING *et al.*, 2000).

Clinicamente, Hb S, Hb C e  $\beta$ -talassemia são as alterações mais importantes (ZAGO; COSTA, 1985; WENNING *et al.*, 2000). De acordo com os dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), estas três hemoglobinopatias no Brasil, por sua prevalência e repercussão clínica, resultam em significativas morbidade e mortalidade específicas (RAMALHO *et al.*, 2003). A  $\alpha^+$ -talassemia (deleção  $-\alpha^{3.7}$  em heterozigose) é a alteração mais frequente no País, ocorrendo em 20-25% da população negra (WENNING *et al.*, 2000), mas as repercussões clínicas são praticamente nulas.

O diagnóstico das hemoglobinopatias é complexo e envolve uma análise que deve considerar dados clínicos, herança genética, idade e qualidade da amostra. Em recém-nascidos, a alta concentração da hemoglobina fetal pode dificultar o diagnóstico

correto e, por isso, é recomendado que o perfil hemoglobínico seja repetido após o sexto mês de vida (FERRAZ; MURAO, 2007), principalmente nos casos duvidosos.

### 2.3 Hemoglobinas Variantes

Em 30 de março de 2010, 1.034 hemoglobinas variantes estruturais estavam registradas no *site Globin Gene Server* (<http://globin.bx.psu.edu/cgi-bin/hbvar/counter>). A maioria é ocasionada por simples substituições nucleotídicas no DNA, com a correspondente troca de aminoácidos na proteína. A maior parte das mutações envolve a cadeia  $\beta$  (532 variantes segundo o mesmo *site*), embora mutações nas cadeias  $\alpha$ ,  $\gamma$  e  $\delta$  também sejam comuns (KIMURA *et al.*, 2008). As duas hemoglobinas variantes mais frequentes e clinicamente significativas na população brasileira são as hemoglobinas S e C. Ambas são de origem africana, reflexo do tráfico de escravos no Brasil colonial (ARAÚJO *et al.*, 2004; ADORNO *et al.*, 2005).

Milhões de pessoas em todo o mundo carregam em seu patrimônio genético hemoglobinas anormais em suas diferentes combinações, com conseqüências que variam de quase imperceptíveis a letais. Sua correta identificação e classificação têm grande importância nas áreas médica, genética e bioquímica (LOENELI *et al.*, 2000).

Apesar de muitas hemoglobinas variantes apresentarem fenótipos hematológicos normais quando em heterozigose, a forma homozigótica ou a herança com outras hemoglobinopatias e talassemias pode resultar em doenças graves, sendo de grande importância o diagnóstico diferencial dessas variantes (SANCHAISURIYA *et al.*, 2004; FUCHAROEN *et al.*, 2007).

A maioria das mutações que altera a estrutura da hemoglobina é pontual e ocorre devido a mudanças nas sequências de nucleotídeos (códon), o que resulta em substituições de aminoácidos nas cadeias das hemoglobinas A, F e A<sub>2</sub>. As propriedades funcionais e físico-químicas da molécula de hemoglobina podem ser alteradas de acordo com o local das substituições dos aminoácidos, que podem ocorrer na superfície, dentro da molécula ou envolvendo o grupo heme. Geralmente, as substituições próximas ou em torno do grupo heme alteram a afinidade da molécula pelo oxigênio ou resultam em uma hemoglobina instável (NAOUM, 1997; HOCKING, 1997; BERTHOLO; MOREIRA, *et al.*, 2006).

A maioria das variantes está em heterozigose e não apresenta, como referido

anteriormente, manifestações clínicas ou hematológicas. No entanto, algumas hemoglobinas podem produzir manifestações clínicas mesmo em heterozigose, podem ser instáveis e resultar em anemia hemolítica crônica ou ter alteração de afinidade pelo oxigênio (JORGE *et al.*, 2007; KIMURA *et al.*, 2008). Por outro lado, algumas variantes não possuem consequência clínica, nem em heterozigose, nem em homozigose (GONZÁLEZ *et al.*, 2008; SANGKITPORN *et al.*, 2002).

### 2.3.1 Hemoglobina S

Dentre as hemoglobinas variantes, a Hb S é a mais frequente, principalmente nos países da África Equatorial, na Arábia, Índia, Israel, Turquia, Grécia, Itália e Estados Unidos, podendo atingir uma prevalência de até 50% em algumas regiões (ADORNO *et al.*, 2005; MURAO; FERRAZ, 2007). O gene da hemoglobina S teve origem multicêntrica, mais frequentemente no continente africano.

A hemoglobina S é a variante mais comum na população brasileira. Sua introdução no Brasil se deu principalmente com a entrada de escravos, durante o regime escravocrata (ZAGO *et al.*, 1983). No país, a frequência do traço falciforme varia de 2% a 8%, conforme a proporção da população negra em cada região (MURAO; FERRAZ, 2007).

A hemoglobina S é decorrente de uma mutação pontual (GAG >GTG; Glu>Val) no códon 6 do gene da  $\beta$ -globina. Essa substituição de nucleotídeo traduz-se em troca do ácido glutâmico pela valina, na extremidade N-terminal da hemoglobina adulta (HbA) (NAOUM, 1997; FRENETTE; ATWEH, 2007). Esta troca tem como consequência uma modificação físico-química da molécula de hemoglobina que pode resultar na polimerização da hemoglobina S em condições de baixa oxigenação. Isso leva à deformação dos glóbulos vermelhos que adquirem a forma de células em foice, clássicas da doença falciforme (DINIZ *et al.*, 2009).

Uma vez que o ácido glutâmico é um aminoácido carregado negativamente – ponto isoelétrico (pI) de 2,77 – e a valina é um aminoácido neutro (pI = 5,97), a substituição desses aminoácidos altera a carga elétrica (pI) da Hb S, resultando na perda de cargas negativas da Hb S em relação à Hb A, o que se traduz na mobilidade mais lenta da Hb S na eletroforese, de modo que ela pode ser distinguida da Hb A (NAOUM, 2000).

O maior estudo de prevalência e distribuição de hemoglobinopatias realizado no Brasil em 1987 mostrou que de 3,08% dos indivíduos analisados com alterações hemoglobínicas, 2,49% eram alterações estruturais, sendo a hemoglobina S a mais prevalente (DAUDT, 2002; SOMMER *et al.*, 2006).

Segundo dados fornecidos pelo Ministério da Saúde, a Bahia, Pernambuco, Rio de Janeiro e Minas Gerais, são os estados onde se observam as maiores prevalências do traço falciforme. No entanto, não há dados epidemiológicos sobre a incidência real da anemia falciforme no país, uma vez que o PNTN vem sendo implantado gradativamente no Brasil (DINIZ *et al.*, 2009). De acordo com o estudo de Januário (2002) em um milhão de recém-nascidos, nasce uma criança com anemia falciforme (Hb SS) a cada 2.500 nascimentos no estado de MG.

Os portadores de traço falciforme (Hb AS) geralmente são assintomáticos. No entanto, na forma homozigótica ou em interação com outras hemoglobinas variantes ou com as beta-talassemias, conhecidas coletivamente como Doença Falciforme, apresenta elevada morbidade e mortalidade, necessitando de tratamento precoce (FERRAZ; MURAO, 2007).

### **2.3.2 Hemoglobinas variantes semelhantes à Hb S**

Algumas hemoglobinas variantes possuem características físico-químicas, mobilidade eletroforética ou perfil cromatográfico muito semelhante às da Hb S, o que pode dificultar e/ou confundir o diagnóstico. Apesar da maioria não apresentar importância clínica, a identificação dessas variantes é de suma importância, pois além dos problemas relacionados à identificação laboratorial, algumas podem resultar em um diagnóstico falso-positivo para a Doença Falciforme. Inconsistências no diagnóstico, como por exemplo, baixa concentração relativa da hemoglobina variante e o teste de falcização negativo, aliados à caracterização da população, podem auxiliar na definição do diagnóstico (FUCHAROEN *et al.*, 2007).

Mais de uma centena de hemoglobinas variantes apresenta migração semelhante à da Hb S em pH alcalino (Chinelato-Fernandes e Bonini-Domingos, 2005). Há hemoglobinas variantes que, por HPLC, são lidas na mesma janela da Hb S e apresentam perfis cromatográficos muito semelhantes a esta variante (VIPRAKASIT *et al.*, 2002; SANCHAISURIYA *et al.*, 2004; FUCHAROEN *et al.*, 2007). Há ainda

variantes que migram, pela focalização isoelétrica, igual à Hb S (BASSET *et al.*, 1978; HOCKING, 1997; VIPRAKASIT *et al.*, 2002; BEZERRA *et al.*, 2009).

Há relatos de hemoglobinas variantes que foram inicialmente identificadas como S e que, posteriormente, comprovou-se por métodos de biologia molecular que não eram Hb S, mas, sim, outras hemoglobinas variantes (ROCHETTE *et al.*, 1994; HOCKING, 1997; VIPRAKASIT *et al.*, 2002; FUCHAROEN *et al.*, 2007; ZAMARO & BONINI-DOMINGOS, 2010).

De acordo com Hocking (1997), há pelo menos três hemoglobinas variantes de cadeia  $\beta$  e cinco variantes de cadeia  $\alpha$ , com focalização isoelétrica em gel de poliacrilamida, igual à da Hb S. Há ainda variantes de cadeia  $\beta$  e de cadeia  $\alpha$  ligeiramente mais lentas ou mais rápidas que a Hb S (variação de até 0,5 mm). Dentre elas, há algumas variantes que possuem importância clínica, por apresentarem redução ou aumento da afinidade pelo oxigênio e/ou por serem instáveis. As hemoglobinas Kokura, G-Norfolk, Inkster, S-Travis e Headington possuem, por exemplo, aumento de afinidade pelo oxigênio. A hemoglobina Moabit além da instabilidade, apresenta redução de afinidade pelo oxigênio. Há ainda a Hb S-Travis (duas mutações concomitantes, sendo uma delas igual à da mutação do gene S), que induz à falcização das hemácias, e a Hb Headington que, além de possuir aumento de afinidade pelo oxigênio, foi descrita em associação com  $(\delta\text{-}\beta)^0$  talassemia. Nas figura 1 e 2 são mostradas algumas hemoglobinas variantes com corrida eletroforética semelhante à da Hb S no gel de poliacrilamida e no gel de agarose, respectivamente, e suas relativas posições.

Estudos revelam que muitas das variantes semelhantes à Hb S citadas por Hocking (1997), podem ser inicialmente confundidas com a Hb S pelos métodos comumente utilizados na triagem de hemoglobinopatias, sendo o diagnóstico diferencial feito por outros métodos complementares.

O Guia Interpretativo editado por Hocking (1997), sob a reconhecida inspiração do Professor Titus Huisman, é utilizado como referência pelo PETN-MG para auxiliar na identificação de hemoglobinas variantes de acordo com sua mobilidade eletroforética (pI). O professor Huisman é considerado fonte de excelência em pesquisas e informações sobre hemoglobinas humanas e é um dos idealizadores do *Globin Gene Server*. Apesar do mapeamento das hemoglobinas se referir aos pontos isoelétricos em eletroforese por focalização isoelétrica (IEF) em gel de poliacrilamida, há achados no PETN-MG que revelam que variante(s) não identificada(s) também se superpõem à

hemoglobina S em gel de agarose (*RESOLVE Systems Hemoglobin Test Kit*).

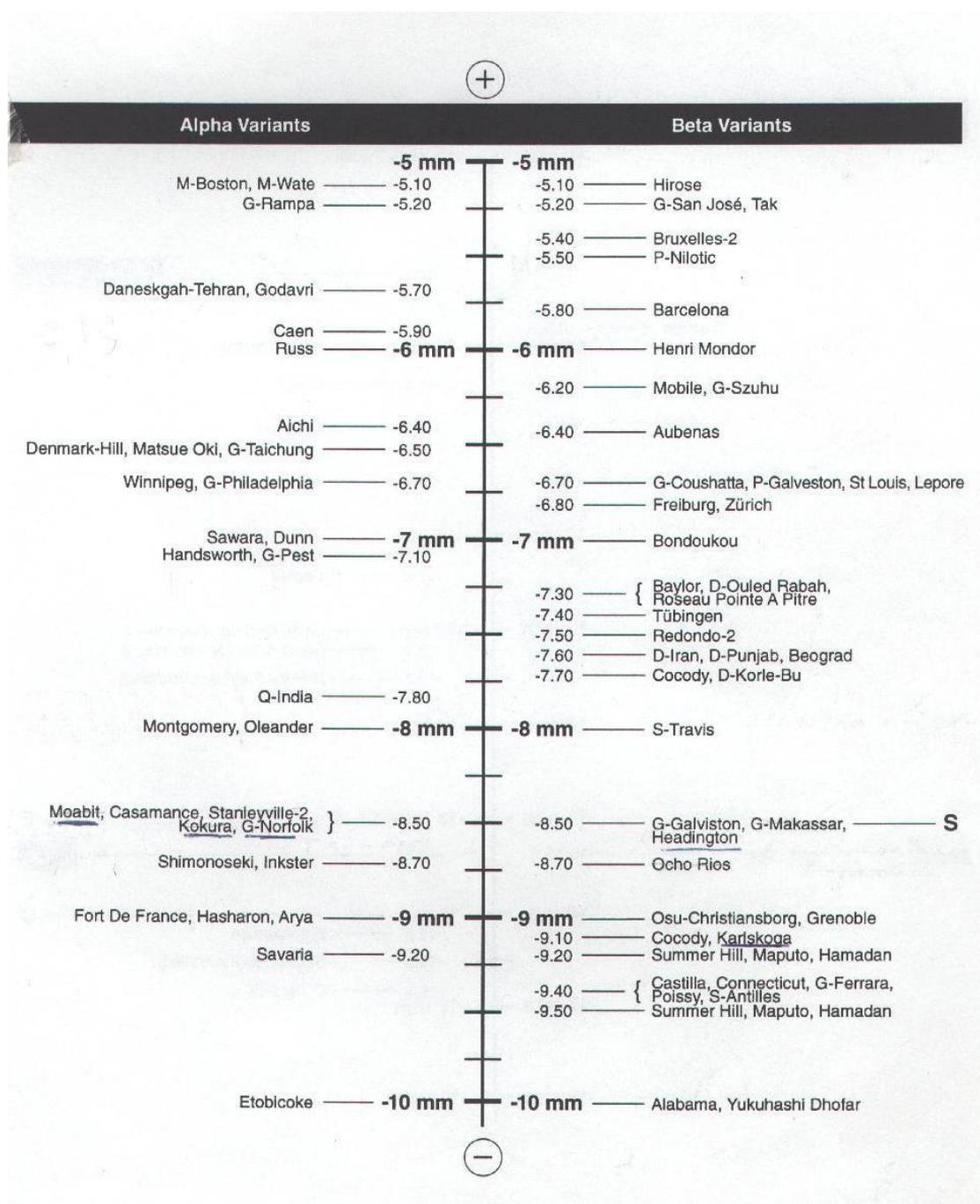


Figura 1: Esquema da localização de algumas hemoglobinas variantes de cadeia  $\alpha$  e  $\beta$ , por focalização isométrica em gel de poliacrilamida, Fonte: Hocking, 1997.

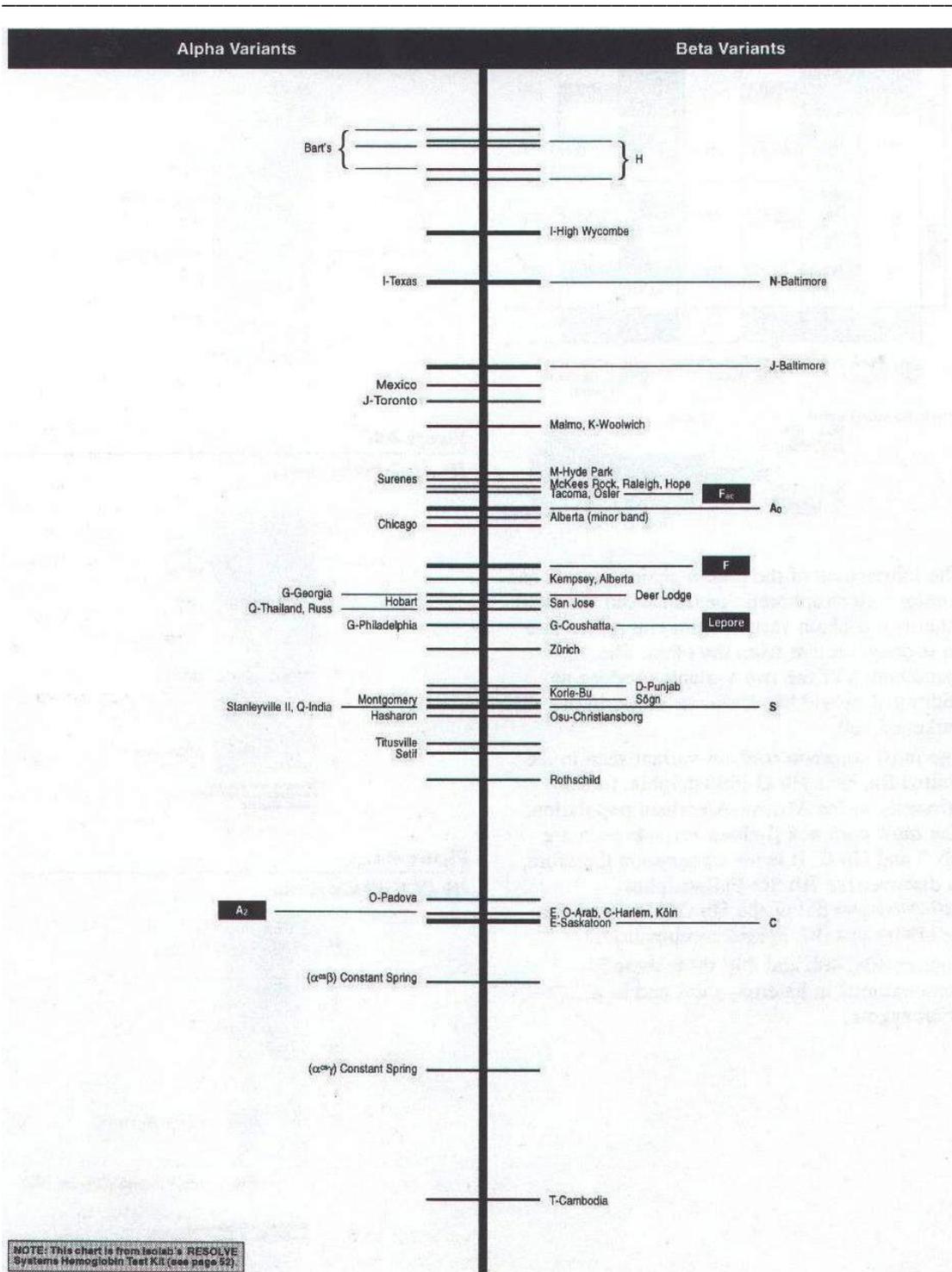


Figura 2 – Esquema da localização de algumas hemoglobinas variantes de cadeia  $\alpha$  e  $\beta$ , por focalização isoeétrica em gel de agarose. Fonte: Hocking, 1997.

### 2.3.2.1 Hemoglobinas variantes de cadeia $\beta$ semelhantes à Hb S

A hemoglobina G-Makassar apresenta mobilidade eletroforética em acetato de celulose e tempo de retenção por HPLC de troca catiônica idênticos ao da Hb S (*S-window*) (SANGKITPORN *et al.*, 2002). Ela foi descrita em 1969 na Indonésia e ocorre devido a uma mutação no códon 6 do gene da beta da globina, o que ocasiona a troca do ácido glutâmico pela alanina (GAG>GCG; Glu>Ala). Viprakasit *et al* (2002) relataram uma família tailandesa na qual vários membros possuíam a Hb G-Makassar. Um deles (a mãe do *propositus*) possuía a hemoglobina variante na concentração de 84%, pois possuía, concomitantemente,  $\beta$ -talassemia<sup>0</sup> no cromossomo homólogo. Nenhuma alteração clínica ou hematológica era atribuível à Hb Makassar. O diagnóstico da hemoglobina variante foi confirmado pelo sequenciamento do DNA e por PCR-RFLP específica para a mutação encontrada. Em heterozigotos ela representa cerca de 45% do total de hemoglobina (GLOBIN GENE SERVER, 2010).

Segundo dados do *Globin Gene Server* (2010), a hemoglobina Headington apresenta mobilidade eletroforética idêntica à da Hb S em pH alcalino e IEF. Ela foi descrita, no estado de heterozigose, em associação com delta-beta talassemia, em uma família indiana. Apresenta, como referido anteriormente, aumento da afinidade pelo oxigênio. A variante é decorrente de uma mutação no códon 72 do gene beta (E16), causando a substituição da serina pela arginina (AGT>AGA; Ser>Arg). Estudos funcionais realizados sugeriram que a maior afinidade da Hb Headington ao oxigênio deve-se à substituição que perturba a interação entre as hélices A, B e E (ROCHETTE *et al.*, 1994).

A hemoglobina Osu-Christiansborg [ $\beta$ 52 Asp > Asn (D3)] e a hemoglobina G-Galveston [ $\beta$ 43 Glu > Ala (CD2)] foram identificadas em dois pacientes, em associação com a hemoglobina S. Em ambos, os padrões eletroforéticos em pH alcalino revelavam apenas as hemoglobinas S, F e A2. Em pH ácido, no entanto, as variantes se separaram da Hb S (McCURDY *et al.*, 1974). No ano de 2004, Souza *et al.* detectaram pela primeira vez no Brasil, no programa de triagem neonatal de São Paulo, a Hb Osu-Christiansborg. Os achados eletroforéticos da variante foram os mesmos encontrados pelos estudos já citados. A mutação foi confirmada pelo sequenciamento do DNA e por análise com enzima de restrição.

O estudo de Bowman *et al.* (1964) mostrou que a hemoglobina variante G-

Galveston, conhecida também como G-Port Arthur e G-Texas, possui mobilidade eletroforética ligeiramente mais rápida que a hemoglobina S em pH alcalino e em pH ácido.

Beresford *et al.* (1972), durante um estudo familiar, detectaram a hemoglobina S em associação com uma nova variante de cadeia beta: a Hb Ocho Rios. A eletroforese em acetato de celulose mostrou somente uma banda na posição da Hb S e outra banda de Hb A<sub>2</sub>, quantificada em 3,3%. No entanto, em meio ácido, percebiam-se duas frações, com semelhantes concentrações, uma migrando na posição de S e outra perto da origem da aplicação e, neste caso, a Ocho Rios. Ela decorre de uma mutação no códon 52 (GAT>GCT; Asp>Ala), na posição externa da hélice D (GLOBIN GENE SERVER, 2010).

A hemoglobina variante Grénoble decorre de uma dupla mutação no gene beta: no códon 51 (CCT>TCT, Pro>Ser (D2)), que ocasiona a substituição da prolina pela serina, no códon 52 (GAT>AAT, Asp>Asn (D3)). A mutação é a mesma que resulta na hemoglobina Osu-Christiansgorg (GLOBIN GENE SERVER, 2010). A única informação encontrada sobre a mobilidade eletroforética da variante é mostrada no mapa citado por Hocking (1997), onde a mesma ocupa uma posição ligeiramente mais lenta que a Hb S (meio milímetro) por eletroforese em gel de poliacrilamida.

A Hb S Travis é decorrente da substituição de dois aminoácidos β6 Glu>Val e β142 Ala>Val (GAG>GTG e GCC>GTC nos respectivos códons). A variante apresenta propriedades semelhantes à da Hb S, com ocorrência da falcização das hemácias na privação de oxigênio, provavelmente devido à mutação na β6. Possui mobilidade eletroforética semelhante à da Hb S em pH alcalino. Algumas diferenças nas propriedades da Hb S e da Hb S-Travis são devidas à segunda substituição, β142 (MOO-PENN *et al.*, 1977).

### 2.3.2.2 Hemoglobinas variantes de cadeia α semelhantes à Hb S

A maioria das variantes estruturais de cadeia alfa corresponde a aproximadamente 25% do total de hemoglobina, quando em heterozigose. No entanto o nível de concentração de algumas destas variantes pode estar aumentado, quando houver coexistência da mutação com a α talassemia (em cis) (LIEBHABER *et al.*, 1986; COSTA *et al.*, 1987).

Segundo Hocking (1997), há cinco hemoglobinas variantes de cadeia  $\alpha$  que podem superpor-se à Hb S, na IEF em gel de poliacrilamida: Hb Stanleyville-II, Hb Moabit, Hb Kokura, Hb G-Norfolk e Hb Casamance. Este achado possui certa relevância devido à possibilidade de diagnóstico laboratorial falso-positivo para a Anemia Falciforme.

A hemoglobina Stanleyville-II caracteriza-se pela troca de uma base única no códon 78 dos genes  $\alpha_2$  ou  $\alpha_1$  (AAC>AAA;  $\alpha 78$  Asn>Lys, EF7), resultando na substituição da asparagina pela lisina (COSTA *et al.*, 1987; DODÉ *et al.*, 1990; WENNING *et al.*, 2000; WAITUMBI *et al.*, 2007; DRAUBE *et al.*, 2007; GONZÁLEZ *et al.*, 2008).

O estudo de Gulbis *et al* (1997) demonstrou que a Hb Moabit migrou, pela eletroforese em pH alcalino e por IEF, ligeiramente mais rápida que a Hb S, numa concentração de aproximadamente 25%. Demonstrou-se, pelo método de espectrometria de massa, que ela decorre de uma substituição no códon 86 do gene da  $\alpha$  globina, com a consequente troca de leucina por arginina (CTG>CGG; 86(F7) Leu>Arg). Esta substituição é responsável por instabilidade da molécula e ainda pode levar, mesmo em heterozigose, a um quadro de leve anemia hemolítica e reticulocitose (*GLOBIN GENE SERVER*, 2010), tornando-se imprescindível a diferenciação diagnóstica da Hb S. Esta hemoglobina apresenta ainda redução da afinidade pelo oxigênio (KNUTH *et al.*, 1979).

A hemoglobina Kokura é também denominada Beilinson, L-Gaslini, Mugino, Tagawa-II, Umi e Yukuhashi-II. Esta variante decorre de uma mutação no códon 47 do gene  $\alpha_2$  (GAC>GGC; (CE5) Asp>Gly) (DELANOE-GARIN *et al.*, 1986; *GLOBIN GENE SERVER*, 2010). Sua mobilidade eletroforética é ligeiramente à frente da Hb S em acetato de celulose em pH alcalino e possui o mesmo ponto isoelétrico da Hb S em gel de poliacrilamida (Hocking, 1997; *GLOBIN GENE SERVER*, 2010).

A Hb G-Norfolk comporta-se eletroforicamente, pela IEF e pelo acetato de celulose em pH alcalino, semelhantemente à Hb Kokura (Hocking, 1997). A mutação ocorre no gene  $\alpha_1$  ou  $\alpha_2$  (GAC> AAC; 85(F6) Asp>Asn). A hemoglobina é estável e parece ter afinidade aumentada pelo oxigênio (*GLOBIN GENE SERVER*, 2010).

As hemoglobinas variantes Shimonoseki, Inkster, Fort De France, Hasharon, Arya e Oleander também fazem parte do grupo das variantes que migram na mesma posição da hemoglobina S, pela eletroforese de acetato de celulose em pH alcalino (*GLOBIN GENE SERVER*, 2010) e podem ser confundidas com a hemoglobina S pela

focalização isoeétrica em gel de poliacrilamida, devido a diferenças mínimas de suas posições em relação à Hb S (Hocking, 1997).

Não foram encontradas na literatura, bem como no *Globin Gene Server*, referências para a Hb Casamance.

## 2.4 Alfa Talassemia

A Talassemia é um desarranjo na expressão de um dos genes das hemoglobinas gerado por diferentes defeitos moleculares, geralmente afetando os genes da  $\alpha$ - ou  $\beta$ -globina e/ou suas regiões reguladoras (ZORAI *et al.*, 2002).

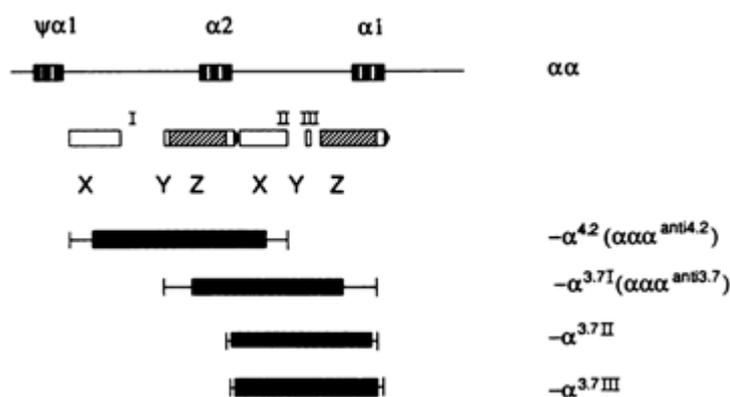
A  $\alpha$ -talassemia constitui um grupo de distúrbios hereditários, de distribuição mundial, e é causada pela deficiência de síntese de cadeias alfa da globina, consequente da alteração sofrida por um ou mais dos quatro genes que as codificam (CANÇADO, 2006).

O grupo dos genes da  $\alpha$  globina está localizado no braço curto do cromossomo 16 e estão arranjados na posição 5'→3' conforme a expressão durante a ontogênese. Apesar dos genes  $\alpha_1$  e  $\alpha_2$  terem grande homologia e codificarem exatamente a mesma cadeia de aminoácidos, a expressão do gene  $\alpha_2$  é de duas a três vezes maior do que a expressão do gene  $\alpha_1$  (LIEBHABER *et al.*, 1986; BOWDEN *et al.*, 1987). Ambos os genes são expressos durante o período embrionário, fetal e na vida adulta (ZORAI *et al.*, 2002).

A figura 3 (HIGGS *et al.*, 1989) mostra que os genes  $\alpha_2$  e  $\alpha_1$  estão localizados dentro de regiões de homologia, representadas pelas letras X, Y e Z, e que são interrompidas por três regiões curtas e não-homólogas, entre X e Y, nas posições 5' e 3' (I e II na figura), e entre Y e Z, na posição 3' (III, na figura). O primeiro conjunto XYZ tem 4,2 kb de “comprimento” (entre os genes  $\alpha_1$  e  $\alpha_2$ ) e o segundo, 3,7 kb (entre os genes  $\alpha_2$  e  $\alpha_1$ ). As mutações deletionais ocorrem por efeito de *crossing-over* desigual, devido ao desalinhamento entre os cromossomos 16 durante o processo de meiose. O *crossing-over* entre as regiões homólogas Z deleta 3,7 kb de DNA, deixando um simples gene  $\alpha_2$  ou, mais frequentemente, um gene híbrido  $\alpha_1/\alpha_2$ , num dos cromossomos. Esse defeito é conhecido por deleção  $-\alpha^{3,7}$  (HIGGS *et al.*, 1989). A

deleção do tipo  $-\alpha^{4.2}$  resulta de *crossing-over* entre as regiões homólogas X e deleta 4,2 kb de DNA, deixando um simples gene  $\alpha_1$ .

A deleção  $-\alpha^{3.7}$  é heterogênea e possui três subtipos diferentes dependendo da localização exata do ponto de quebra (*breakpoint*) da mutação no gene (BOWDEN *et al.*, 1987; BALLAS, 2001). O tipo I é mais prevalente nos africanos e americanos enquanto o tipo III é mais prevalente em asiáticos (BALLAS, 2001).



**Figura 3: Mutações deletionais mais comuns causadoras da  $\alpha$ -talassemia. Fonte: Higgs *et al.*, 1989.**

As mutações talassêmicas são classificadas como  $\alpha^+$ , deleção de um gene ( $-\alpha$ ), ou  $\alpha^0$ , deleção de ambos os genes ( $--$ ) em um único alelo (ZORAI *et al.*, 2002; CANÇADO, 2006).

As  $\alpha$ -talassemias são caracterizadas de acordo com o número de genes afetados, podendo atingir de um a quatro genes da  $\alpha$  globina. No portador “silencioso” (ou talassemia alfa mínima), ocorre a deleção de apenas um gene alfa ( $-\alpha/\alpha\alpha$ ); no traço alfa talassêmico (ou talassemia alfa menor), há a deleção de dois genes alfa ( $-\alpha/-\alpha$  ou  $--/\alpha\alpha$ ); na doença da Hb H (ou talassemia alfa intermédia), 3 genes  $\alpha$  são deletados ( $--/-\alpha$ ) e na síndrome da hidropsia fetal há deleção de 4 genes ( $--/--$ ). A alfa-talassemia mínima é a mais comum e é praticamente assintomática e com alterações laboratoriais mínimas (leve microcitose e hipocromia) ou inexistentes o que dificulta o diagnóstico laboratorial (NAOUM, 1997; CANÇADO, 2006).

Com a diminuição ou a ausência da síntese da cadeia  $\alpha$ , o acúmulo das cadeias  $\gamma$ -globina e  $\beta$ -globina livres formam os homotetrâmeros não-funcionais Hb de Bart ( $\gamma_4$ )

e Hb H ( $\beta_4$ ), respectivamente. A Hb de Bart é frequentemente usada como um marcador para identificar a presença da  $\alpha$ -talassemia em neonatos. Similarmente, os níveis da Hb H correlacionam-se com a gravidade da doença da Hb H. No entanto, a correlação entre o nível da Hb de Bart e o genótipo é mais difícil de estabelecer, especialmente quando ocorre a perda da expressão de um único gene  $\alpha$  (ZORAI *et al.*, 2002).

O portador silencioso é o tipo mais comum entre as talassemias alfa. Os portadores do traço alfa talassêmico, apesar de serem normais sob o ponto de vista clínico, apresentam microcitose com alterações da morfologia eritrocitária e discreto grau de anemia (nível total de hemoglobina entre 10 e 13 g/dL) (CANÇADO, 2006; NAOUM, 1997).

Menos frequentemente, a alfa talassemia é causada por mutações pontuais, pequenas deleções ou inserções que afetam o processamento ou tradução do RNA, ou por instabilidade pós-transcricional do RNA. Um número significativo de mutações alfa talassêmicas não deletoriais vem sendo descritas nos últimos tempos. A maioria delas tem sido identificada por clonagem molecular ou sequenciamento direto do cluster do gene alfa (HARTEVELD *et al.*, 1996).

As formas brandas da alfa talassemia atingem de 10-20% da população em partes da África subsaariana, aproximadamente 40% ou mais em algumas populações do Oriente Médio e Índico, e 80% no norte da Papua Nova Guiné e grupos isolados no nordeste da Índia (WEATHERALL; CLEGG, 2001).

A deleção  $-\alpha^{3,7}$  é encontrada mundialmente, sendo mais prevalente em africanos, indianos, em populações mediterrâneas, chineses e populações do leste asiático. Estudos realizados no Brasil mostraram ser esta deleção a mais comum na população brasileira (SOUZA *et al.*, 2009). Estima-se que a prevalência do portador silencioso seja de 10% a 20%, e o traço alfa-talassêmico de 1% a 3%. Entretanto, se considerarmos os indivíduos afrodescendentes, essa frequência pode alcançar 20% a 25% (CANÇADO, 2006).

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Confirmar ou excluir a presença da hemoglobina S em 126 crianças cujos perfis eletroforéticos e/ou perfis cromatográficos (HPLC) nos exames de triagem neonatal foram julgados como indeterminados (“Ind”) e que, reanalisados em amostra ao sexto mês de vida, apresentaram-se com corrida eletroforética, por focalização isoelétrica, semelhante à da hemoglobina S.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

1. Diferenciar a Hb S de outras variantes não-S que se comportam como hemoglobina S à eletroforese por focalização isoelétrica no sexto mês de vida de lactentes triados pelo PETN-MG;
2. Verificar a distribuição geográfica, em Minas Gerais, dessas hemoglobinas variantes;
3. Verificar se os padrões fenotípicos obtidos por IEF e HPLC ao nascimento, bem como a IEF posterior ao sexto mês de vida, são capazes de distinguir a Hb S dessas variantes;
4. Sequenciar a variante encontrada em duas crianças, em provável homozigose, e em seus familiares; verificar sua relevância clínica;
5. A partir dos resultados obtidos, tentar estabelecer critérios para liberação do resultado laboratorial das hemoglobinas em estudo no PETN-MG.

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 Tipo de estudo**

Trata-se de uma pesquisa em parte retrospectiva e em parte prospectiva.

### **4.2 Considerações Éticas**

O projeto de pesquisa foi aprovado nas instâncias acadêmicas da Faculdade de Medicina da UFMG e dos Comitês de Ética em Pesquisa da UFMG (Anexo A), da Fundação Centro de Hematologia e Hemoterapia de Minas Gerais - Hemominas (Anexo B) e pela Diretoria de Ensino, Pesquisa e Extensão do Hospital das Clínicas da UFMG (Anexo C).

### **4.3 Financiamento**

Esta pesquisa recebeu o apoio logístico do Núcleo de Ações e Pesquisas em Apoio e Diagnóstico - Nupad, órgão complementar da Faculdade de Medicina da UFMG e referência em Triagem Neonatal em Minas Gerais (Anexo D).

### **4.4 Casuística**

Foram selecionadas para participar do estudo 293 crianças, triadas para hemoglobinopatias no Programa Estadual de Triagem Neonatal de MG (PETN-MG) no período de março de 1998 a junho de 2008. O primeiro resultado da triagem neonatal destas crianças havia sido liberado como indeterminado, já o resultado da amostra do 6º mês de vida, registrado como perfil eletroforético semelhante ao da hemoglobina S, no sistema do Banco de Dados do PETN-MG.

Os dados para seleção destas crianças foram obtidos do banco de dados *SQL Server 2000* (Microsoft®), utilizado rotineiramente pelo PETN.

Após a exclusão dos casos em que não foi possível a participação (os motivos das exclusões encontram-se detalhado no tópico 5), fazem parte deste estudo 126 crianças com perfil eletroforético semelhante ao da hemoglobina S.

#### **4.5 O Programa Estadual de Triagem Neonatal para Doença Falciforme e Outras Hemoglobinopatias (PETN-MG)**

As amostras de sangue são coletadas, preferencialmente no quinto dia de vida, do calcanhar dos recém-nascidos, em papel-filtro tipo Schleicher e Schuell 903 (Dassel, Alemanha), seguindo os critérios estabelecidos para a triagem neonatal das demais doenças triadas (JANUÁRIO; MOURÃO, 1998).

Após a secagem, as amostras são acondicionadas em envelope contendo todos os dados de identificação da criança e transportadas, por correio ou portador, ao laboratório de triagem neonatal do Nupad, localizado na Faculdade de Medicina da UFMG, em Belo Horizonte. Os procedimentos para coleta, reconvocação, conservação e envio das amostras ao laboratório, bem como a liberação dos resultados, obedecem às normas estabelecidas pelo programa (JANUÁRIO; MOURÃO, 1998; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005).

##### **4.5.1 Metodologias utilizadas no Laboratório de Hemoglobinopatias do Nupad**

Do início do programa para hemoglobinopatias (março de 1998) até março de 2002, o laboratório utilizou na determinação do perfil hemoglobínico dos recém-nascidos, exclusivamente, o método de Eletroforese por Focalização Isoelétrica (IEF) (PAIXÃO *et al.*, 2001). Foram utilizados insumos e equipamentos de eletroforese Wallac Resolve Systems® (Ohio, EUA), *Resolve Neonatal Hemoglobin Screen Kit* (PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Finlândia). As amostras com resultados alterados ou duvidosos foram repetidas pelo mesmo método, para confirmação.

A partir de março de 2002, o laboratório passou a trabalhar também com a técnica de Cromatografia Líquida de Alta Resolução (HPLC) utilizando o equipamento *Bio-Rad Variant Hemoglobin Test System* (unidades de 110 V), insumos e *Kit Sickle*

*Cell Short Program*, da *BIO-RAD*. Atualmente, as amostras de crianças com idade até trinta dias de vida, são processadas preferencialmente pela técnica de HPLC e aquelas com resultados alterados ou duvidosos são reavaliadas pela IEF para confirmação (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005).

#### **4.5.1.1 Princípios dos métodos utilizados no Laboratório de hemoglobinopatias**

##### **4.5.1.1.1 Cromatografia Líquida de Alta Resolução (HPCL) - Kit *Variant TM Sickle Cell Short Program***

O *Kit Sickle Cell Short Program* utiliza os princípios do HPLC de troca catiônica.

As amostras diluídas são mantidas no *Variant* a  $12 \pm 2^\circ$  C na câmara do amostrador automático e, posteriormente, são injetadas sequencialmente no fluxo de análise. Por meio da utilização de um gradiente de íon fosfato, gerado pela mistura de dois tampões de diferentes forças iônicas para eluição, as hemoglobinas são separadas por uma coluna de troca catiônica.

Duas bombas de duplo pistão controlam o fluxo da mistura dos tampões (1 e 2) de eluição na coluna analítica. A força iônica desta mistura é incrementada através do aumento da contribuição do tampão 2. À medida que a força iônica da mistura aumenta, maior é a quantidade de hemoglobinas retidas que atingem a eluição a partir da coluna analítica.

Um fotômetro de filtros com duplo comprimento de onda (415 e 690 nm) monitoriza a eluição a partir da coluna. À medida que as hemoglobinas eluem na coluna e passam pelo fotômetro de filtros, são detectadas alterações na absorbância a 415 nm. Um filtro secundário de 690 nm corrige na linha de base os efeitos causados pela mistura de tampões de diferentes forças iônicas. Os dados são processados e é gerado um cromatograma (gráfico de absorbância *versus* tempo) impresso, que contém os diferentes picos referentes às hemoglobinas identificadas em diferentes janelas, o tempo de retenção, a área das mesmas e o percentual relativo de cada uma delas. Cada hemoglobina tem um tempo de retenção característico. O tempo de retenção é medido desde o momento da injeção da amostra até o ponto máximo de cada pico. A

identificação das hemoglobinas é feita pela comparação do tempo de retenção da hemoglobina desconhecida com o tempo de retenção de hemoglobinas conhecidas, analisadas no mesmo sistema (BIO-RAD LABORATORIES, 2005; COLAH, *et al.* 2007;).



Figura 4: Foto do *Variant*<sup>TM</sup> utilizado em HPLC, Kit *Sickle Cell Short Program*.

#### 4.5.1.1.2 Eletroforese por Focalização Isoelétrica (IEF) - *Hemoglobin Test Kit*

A IEF é um método de eletroforese que separa proteínas tendo como base seus pontos isoelétricos (pI) em um gradiente de pH (ROCKING,1997) .

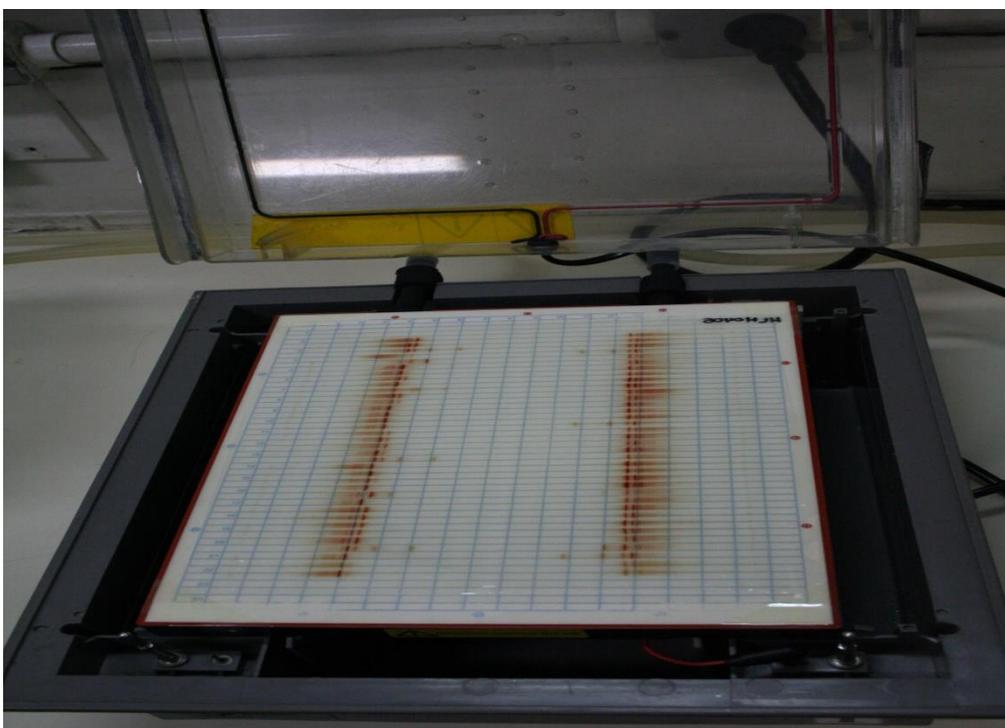
A separação das hemoglobinas é realizada através da aplicação da amostra de hemolisado sobre um gel de agarose contendo anfolitos *RESOLVE* com pH entre 6 e 8.

Os anfolitos *RESOLVE* são compostos de moléculas anfotéricas de baixo peso molecular e variados pontos isoelétricos. Quando uma corrente elétrica é aplicada no gel, estas moléculas migram sobre o gel até seus pontos isoelétricos (pI's), formando um gradiente de pH estável, geralmente entre 6 e 8 (HEMOGLOBIN TEST KIT, 2003).

As proteínas são formadas por cadeias de aminoácidos que possuem propriedades anfotéricas (podem ser carregadas positivamente ou negativamente). Essas

propriedades deixam as proteínas carregadas quando em meio líquido podendo movimentar-se na presença de uma corrente elétrica. O pH de uma solução na qual um aminoácido é colocado determina suas cargas, modificando seus grupos (carboxi ou amino), tornando-os positivos ou negativos de acordo com o pH.

Quando uma corrente elétrica é aplicada, as hemoglobinas migram sobre o gel até alcançarem a área onde seus pI's se igualem ao pH correspondente no gel. O ponto isoelétrico corresponde à carga total zero da proteína: neste ponto, o número das cargas negativas se iguala ao das cargas positivas e a migração cessa. No ponto isoelétrico cessa a difusão da hemoglobina focalizando uma banda fina e discreta.



**Figura 5: Cuba eletroforética de IEF contendo um gel com a corrida eletroforética já processada**

### **4.5.2 Protocolos utilizados pelo PETN-MG para a liberação dos resultados das hemoglobinopatias**

#### **4.5.2.1 Protocolo utilizado para a análise do resultado do HPLC**

Para auxiliar na interpretação dos dados fornecidos pelo *Variant*, utiliza-se o *Software VDMS 2000 – Derived Fields*, interfaceado com um *software* desenvolvido no

Nupad. Através de regras pré-determinadas, o programa gera uma sugestão de perfis hemoglobínicos. Os perfis sugeridos são, então, analisados por duas pessoas qualificadas responsáveis pela liberação dos resultados no sistema. A análise é realizada em duas etapas consecutivas.

### 1ª etapa: realizada por um primeiro examinador

- Analisa-se o perfil sugerido, paralelamente com o cromatograma e os dados referentes à amostra, como por exemplo, a idade da criança e a idade da amostra ao processamento;
- Correlaciona-se a concentração relativa de cada hemoglobina com a idade da criança à ocasião da coleta da amostra;
- Avalia-se a área total de hemoglobina lida pelo *Variant*;
- Analisa-se o traçado cromatográfico (característica dos picos, linha de base, etc).

Nesta etapa o analista libera uma pré-análise dos resultados, podendo ou não "emitir" o resultado final da referida amostra.

### 2ª etapa: realizada por um segundo técnico qualificado

Realiza-se a interpretação conjunta da primeira etapa com a pré-análise, em especial nas amostras cujos resultados finais não foram liberados pelo primeiro analista.

Alguns resultados obrigam à repetição da análise da amostra pelo método de focalização isoelétrica (IEF), como por exemplo:

- Resultados compatíveis com hemoglobinopatias clinicamente significativas (FS, FSC, etc);
- Presença das hemoglobinas variantes D ou E;
- Presença de picos de frações desconhecidas ("unknown") acima de 5%;
- Cromatogramas fora do "padrão de normalidade";
- Presença de hemoglobinas variantes com concentrações muito altas (razão Hb A/variante menor que 0,6) ou concentrações muito baixas (razão Hb A/variante maior que 3,0);

- Achados cromatográficos sugestivos de transfusão de sangue anterior à coleta da amostra;
- Área de hemoglobina total muito baixa (< 500.000);
- Pico na região da Hb Bart's acima de 15%;

#### **4.5.2.2 Protocolo utilizado para a análise do resultado da IEF**

A interpretação dos resultados é realizada em duplo cego por, no mínimo, duas pessoas qualificadas.

Para a leitura dos resultados, utiliza-se uma régua escolar transparente de 30 cm, graduada em mm, com a qual se mede a distância existente entre as frações hemoglobínicas, tendo como referência o padrão AFSC (*Isoscan Hemoglobin Control*) utilizado na técnica.

Ao final realiza-se a interpretação conjunta da corrida eletroforética com os resultados da cromatografia, correlacionando-se as leituras feitas pelos analisadores com os resultados sugeridos pela HPLC. O resultado final a ser liberado dependerá desta análise conjunta.

O quadro 1 resume as condutas adotadas diante dos resultados finais liberados.

**Quadro 1**  
**Condutas adotadas pelo PETN-MG após a liberação de alguns diagnósticos laboratoriais**

Resultado final	Conduta
Resultado positivo para doença falciforme ou outra hemoglobinopatia	Encaminhamento médico
Perfil hemoglobínico indeterminado (“Ind”)	Solicitação de nova amostra no 6º mês de vida
Resultado compatível com transfusão de sangue anterior à coleta	
Resultado inconclusivo devido à prematuridade extrema	
Resultado inconclusivo devido à qualidade da amostra	Solicitação de coleta imediata de nova amostra

#### 4.6 Metodologias utilizadas na pesquisa

##### 4.6.1 Coleta das amostras

A partir das informações existentes no banco de dados do Nupad, foi realizado contato com os pais ou os responsáveis pelas crianças, por meio de telefone e através de carta convidando-os a participar da pesquisa (Anexo E e F). Estes foram devidamente informados a respeito das propostas do estudo e foi-lhes solicitado dirigirem-se às Unidades Básicas de Saúde (UBSs), responsáveis pela coleta de sangue da criança, e para assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE (Anexo G e H), após receberem a carta-convite e caso concordassem em participar da pesquisa.

Os responsáveis pela Triagem Neonatal nas UBSs também receberam um comunicado oficial do Nupad com informações sobre a pesquisa, assim como sobre a realização da coleta das amostras (Anexo I). Foi-lhes solicitado que colhessem a assinatura dos pais ou responsáveis pela criança no TCLE, auxiliando-os no entendimento do mesmo. O serviço de busca ativa das UBSs também auxiliou na localização e contato de crianças cujos endereços estavam desatualizados ou eram residentes em zona rural.

A coleta de sangue total foi venosa e de acordo com o procedimento de cada Unidade de Saúde. Porém, conforme orientação, o sangue foi imediatamente transferido

para papel filtro, o mesmo utilizado para a realização da Triagem Neonatal, de forma a facilitar o envio e conservar por mais tempo a amostra de sangue. As amostras receberam o mesmo código numérico e sequencial adotado na realização da triagem neonatal da criança. O transporte e a conservação do papel filtro obedeceram às normas estabelecidas pelo programa (JANUÁRIO; MOURÃO, 1998); MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005.

Conforme previamente estabelecido pelo projeto, em duas crianças homozigotas para uma hemoglobina variante desconhecida, e seus respectivos pais, a coleta de sangue total foi feita em tubos de aproximadamente 5 mL com anticoagulante EDTA, para realização de nova IEF, de Reação da Cadeia de Polimerase (PCR) alelo-específica para o gene com a mutação correspondente à Hb S, de PCR seguida de sequenciamento dos genes das globinas alfa e beta, e de exames laboratoriais rotineiros (ver a seguir). Os tubos foram rotulados com os dados do paciente e entregues ao laboratório de triagem neonatal do Nupad. O material que não foi imediatamente enviado ao laboratório foi conservado em geladeira até sua entrega, o que sempre ocorreu em, no máximo, 24 horas após a coleta. As amostras recebidas pelo laboratório foram mantidas sob refrigeração em temperatura entre 4°C e 8°C até seu processamento.

Todas as amostras foram protocoladas e receberam um número de identificação, resguardando o sigilo da identificação das crianças e de seus familiares.

### **4.6.2 Realização da Eletroforese por Focalização Isoelétrica (IEF)**

As novas amostras, colhidas após a assinatura do TCLE, foram submetidas à IEF (PAIXÃO *et al.*, 2001) em duplicata, num mesmo gel, identificadas tão somente pela mestranda, sem conhecimento da disposição das amostras em cada gel por parte das pessoas que iriam ler os resultados.

A leitura dos resultados foi realizada por três observadores independentes, sendo dois deles experientes e um não-experiente, mas treinado previamente, na tentativa de se estabelecer um padrão de leitura do resultado do perfil hemoglobínico, das hemoglobinas variantes na região da Hb S, conforme as mobilidades eletroforéticas. A análise dos géis foi auxiliada pelo uso de uma régua, conforme protocolo anteriormente descrito, com a qual foi medida a distância existente entre a fração correspondente à hemoglobina A e as hemoglobinas não-identificadas, tendo como referência o padrão

AFSC (*Isoscan Hemoglobin Control*) utilizado na técnica. Para padronização da análise, foi adotada a seguinte regra:

- Classificação A: hemoglobina aparentemente distinta da S, um pouco mais rápida (com corrida de até 0,5 mm mais rápida) em relação à Hb S controle;
- Classificação B: hemoglobina indistinguível da S em relação ao controle S (mesma posição da Hb S controle);
- Classificação C: hemoglobina aparentemente distinta da S, um pouco mais lenta (com corrida de até 0,5 mm mais lenta) em relação à Hb S controle;

Foi realizada a quantificação das concentrações das frações hemoglobínicas e verificação de seus pontos isoelétricos, utilizando-se o programa *IsoScan Software* da *Isoscan® Imaging System*.

#### **4.6.3 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) alelo-específica para a detecção da mutação que origina a Hb S (códon 6 do éxon 1, GAG>GTG)**

Foi encaminhado ao Laboratório de Genética e Biologia Molecular do Nupad, um círculo do papel filtro contendo o sangue coletado de todas as crianças. Em dois casos foram também enviadas amostras coletadas dos familiares (pai e mãe) para a realização da PCR e sequenciamento do DNA (ver adiante).

O DNA das amostras foi extraído utilizando-se o método descrito por Walsh *et al.* (1991), com pequenas modificações visando à melhoria da extração. As etapas do procedimento estão no Anexo J.

O DNA de todas as amostras foi submetido primeiramente à amplificação de parte do gene da  $\beta$ -globina, gerando um fragmento controle de 310 pb que inclui todo o éxon 1 (90 bp), flanqueado por regiões 5' (99 bp) e 3' (121 bp) ao mesmo. Os *primers* utilizados foram: *forward* **5'GAG CCA GGG CTG GGC ATA AAA GTC AG 3'**; *reverse* **5' GGG AAA ATA GAC CAA TAG GCA GAG AG 3'**.

Para detecção da mutação GAG>GTG (Glu>Val, códon 6), o DNA extraído foi amplificado por meio de PCR alelo-específica, usando-se os iniciadores *S1 forward* **5' TGT CAT CAC TTA GAC CTC AC 3'** e *G37 reverse* **5'AGT AAC GGC AGA CTT CTC CA 3'**, estando em letra com formato maior a base Adenina complementar

ao nucleotídeo mutante Timina. Havendo mutação, é gerado um fragmento de 211 pb (SANCHAISURIYA *et al.*, 2004).

Foram utilizados controle positivo (amostra sabidamente positiva para Hb S), cedido pelo Laboratório de Triagem Neonatal do Nupad, e controle negativo (água bidestilada). A padronização das reações de PCR alelo-específica e do fragmento-controle foi semelhante e feita no laboratório de Genética e Biologia Molecular do Nupad (Anexo J).

A eletroforese dos fragmentos gerados foi realizada em gel de poliacrilamida 6% com ureia. Em cada canaleta do gel, foram aplicados 10µl do produto amplificado, padrão de peso molecular e controles (positivo e negativo) da reação de PCR. O resultado foi visualizado por meio da coloração por nitrato de prata e analisado a partir da comparação visual dos fragmentos de DNA obtidos com o padrão de peso molecular. Todos os géis foram fotografados pelo sistema de captura de imagem pelo Programa *Gel-pro Analyzer v.3.1* (Media Cybernetics).

#### **4.6.4 Realização da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para o diagnóstico molecular de alfa-talassemia**

Para a detecção de deleções do gene da alfa-globina nas duas famílias acima referidas, foi realizada, na Fundação Hemominas, a PCR *multiplex* para sete tipos de deleção da alfa talassemia.

Para as reações de PCR foram desenhados oligonucleotídeos (*primers*) específicos para cada uma das sete principais deleções causadoras de  $\alpha$ -Tal, segundo Chong *et al.* (2000 a, b e c). A identidade de cada deleção foi obtida pela determinação do tamanho do fragmento amplificado em cada reação. Visto que qualquer uma das sete deleções remove parte ou todo o gene  $\alpha 2$ , sua amplificação, juntamente com a amplificação de um alelo de deleção, indica que a mutação encontra-se em heterozigose. Como controle positivo para o sucesso da amplificação do DNA, foi utilizado um segmento de 2.350 pares de base (pb), referente à região 3' não-transcrita do gene LIS 1 (fator plaquetário), localizado no cromossomo 17.

Os dados necessários para a produção dos oligonucleotídeos foram obtidos das publicações de Chong *et al.* (2000 a, b e c) e suas sequências conferidas com as

informações disponíveis no NCBI utilizando a ferramenta *BLAST*. O Quadro 2 contém informações dos oligonucleotídeos utilizados.

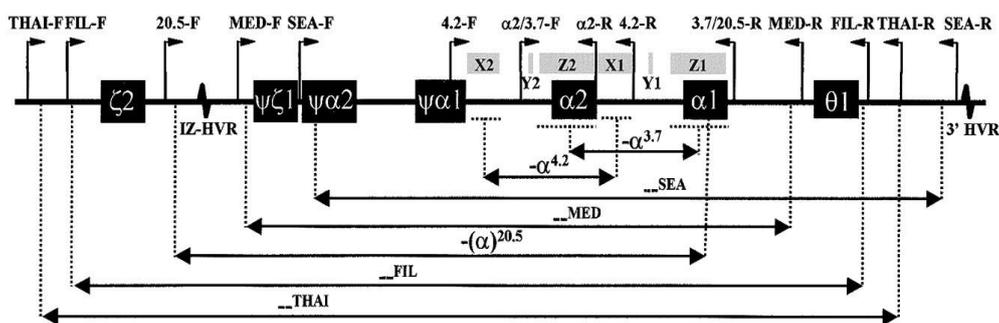
**Quadro 2**  
**Sequência de oligonucleotídeos para cada tipo de deleção da  $\alpha$ -talassemia, respectivas concentrações utilizadas nas reações de PCR, e tamanho esperados dos amplicons.**

Nome	Sequência 5' - 3'	Concentração	Tamanho do fragmento esperado
LIS1-F	ATACCATGGTTACCCATTGAGC	0.5 $\mu$ M	2350 pb
LIS1-R	AGGGCTCATTACATGTGGACCC	0.5 $\mu$ M	
$\alpha$ 2/3.7-F	CCCCTCGCCAAGTCCACCC	0.2 $\mu$ M	2022/2029 pb
3.7/20.5-R	AAAGCACTCTAGGGTCCAGCG	0.2 $\mu$ M	
$\alpha$ 2-R	AGACCAGGAAGGGCCGGTG	0.2 $\mu$ M	1800 pb
4.2-F	GGTTTACCCATGTGGTGCCTC	0.5 $\mu$ M	1628 pb
4.2-R	CCCGTTGGATCTTCTCATTTCCC	0.5 $\mu$ M	
SEA-F	CGATCTGGGCTCTGTGTTCTC	0.2 $\mu$ M	1349 pb
SEA-R	AGCCACGTTGTGTTTCATGGC	0.2 $\mu$ M	
THAI-F	GACCATTCCTCAGCGTGGGTG	0.3 $\mu$ M	1153 pb
THAI-R	CAAGTGGGCTGAGCCCTTGAG	0.3 $\mu$ M	
20.5-F	GCCCAACATCCGGAGTACATG	0.2 $\mu$ M	1007 pb
MED-F	TACCCTTGCAAGCACACGTAC	0.2 $\mu$ M	807 pb
MED-R	TCAATCTCCGACAGCTCCGAC	0.2 $\mu$ M	
FIL-F	TTTAAATGGGCAAAACAGGCCAGG	1.0 $\mu$ M	546 pb
FIL-R	ATAACCTTTATCTGCCACATGTAGC	1.0 $\mu$ M	

A Figura 6 representa esquematicamente o grupamento do gene  $\alpha$  indicando a extensão de cada deleção e a posição relativa de cada oligonucleotídeo.

A reação da PCR foi padronizada para permitir a detecção das sete deleções em uma reação de tubo único. Os detalhes desta padronização encontram-se no Anexo K.

Para visualização dos amplicons foi realizada eletroforese em gel de agarose 1% contendo 1  $\mu$ l brometo de etídio. O gel foi visualizado no transiluminador de luz ultravioleta (*Imagemaster VDS*) para análise dos fragmentos amplificados e caracterização do genótipo dos pacientes e familiares.



**Figura 6: Ilustração do *cluster* do gene alfa, extensão das deleções e posição dos oligonucleotídeos. Fonte: Chong *et al.*, 2000a**

#### 4.6.5 Sequenciamento dos genes da beta e alfa globina nas famílias de duas crianças homocigóticas para hemoglobina variante detectada por IEF

Para extração do DNA a partir do sangue total, foi utilizada a mesma resina anteriormente citada (Anexo J). Para amplificação dos 3 éxons da globina beta foram utilizados os 3 pares de iniciadores desenhados por Chingchang *et al.* (2005). As condições da PCR estão descritas no Anexo J. Os fragmentos amplificados pela PCR foram purificados seguindo-se um protocolo de purificação por precipitação alcoólica adaptado de *Automated DNA Sequencing – Chemistry Guide (Applied Biosystems)*, protocolo no Anexo J. Em seguida, foi feita a reação de sequenciamento utilizando-se o kit *Big Dye Terminator* versão 3.1 (*Applied Biosystems*), segundo instruções do fabricante. Foi feita uma reação para o iniciador *forward* e outra para o *reverse* para cada éxon. Em seguida, o produto foi novamente purificado seguindo-se um protocolo semelhante ao já descrito, ver Anexo J. Posteriormente foi realizada a eletroforese capilar em sequenciador automático modelo *ABI prism 3100-Avant Genetic Analyser (Applied Biosystems)*. Os resultados obtidos foram analisados por meio do software *Sequencing Analysis* (versão 3.7) e com o auxílio do programa de alinhamento de sequências *Bioedit* (versão 3.0)

Para amplificação dos 3 éxons da globina alfa foi utilizada a seguinte estratégia que leva em conta a presença de deleção do gene alfa, do tipo 3.7, em homocigose nas crianças e em heterocigose nos pais. Inicialmente foi feita a amplificação do gene híbrido com os iniciadores S7 e FH (Quadro 3). O fragmento obtido (1.242 pb) foi submetido a uma segunda PCR (*nested PCR*) com os iniciadores S3 e FH e, no caso da criança id 62, também com os iniciadores S1 e FH. Os subfragmentos obtidos foram

sequenciados a partir de S3 (e S1, no caso da criança id 62) e FH em sequenciador automático modelo ABI *prism* 3100 (*Applied Biosystems*). Os dados obtidos foram analisados com o auxílio do programa *Bioedit*.

**Quadro 3**  
**Iniciadores do processo de sequenciamento do gene híbrido**  
**- $\alpha^{3.7}$  em homozigose, nos recém-nascidos que continha uma hemoglobina variante**  
**desconhecida**

Iniciador	Tipo	Composição (5' - 3')	Posição na sequência do GeneBank NG_000006.1
S7*	<i>forward</i>	TGG AGG GTG GAG ACG TCC TG	33537 a 33556
S1**	<i>forward</i>	CAC AGA CTC AGA GAG AAC C	33753 a 33771
S3**	<i>forward</i>	CAC GGC AAG AAG GTG GCC GAC	34067 a 34087
FH***	<i>reverse</i>	AAA GCA CTC TAG GGT CCA GCG	38582 a 38562

\* Dodé *et al.*, 1990.

\*\* Zorai *et al.*, 2002.

\*\*\* Corresponde ao iniciador denominado 3.7/20.5-R por: Tan *et al.*, 2001.

#### 4.6.6 Realização de exames complementares para uma das crianças com variante em homozigose (id 62)

Esta etapa foi realizada no laboratório de Hematologia do Hospital das Clínicas da UFMG, por uma equipe técnica especializada, conforme aprovação da DEPE-UFMG.

Esta avaliação constou de:

- a) Hemograma: dados obtidos usando um analisador hematológico automático e multiparamétrico (*Sysmex* XE 2100 D);
- b) Quantificação da hemoglobina fetal, com a utilização do método de Betke modificado (valor de referência: 0,2 a 1,2%);
- c) Dosagem da hemoglobina A<sub>2</sub>, realizada pela eletroforese em acetato de celulose, por eluição (valor de referência: 2,3 a 3,5%);
- d) Hematoscopia, por meio da análise óptica após coloração pelo método de *May-Grunwald-Giemsa*;

- e) Contagem de reticulócitos, utilizando-se o método de coloração pelo azul de cresil brilhante (valor de referência: 0,5 a 1,8%).
- f) Pesquisa de drepanócitos, utilizando-se o método de metabissulfito de sódio a 2% *in vitro*.

#### **4.6.7 Análise dos resultados da Cromatografia de Alta Resolução (HPLC) nas amostras dos recém-nascidos com hemoglobinas variantes**

Para a análise do perfil hemoglobínico sugerido pelo HPLC, à época do nascimento da criança, foram recuperados no sistema do Nupad, os resultados fornecidos automaticamente pelo método. Infelizmente, não foi possível a recuperação dos cromatogramas em papel.

#### **4.6.8 Metodologia de apresentação dos resultados**

As análises feitas nos géis de IEF foram tabuladas por amostra e, depois, agrupadas conforme a classificação de mobilidade eletroforética em relação à da hemoglobina S (um pouco mais rápida, indistinguível ou um pouco mais lenta). As leituras dos três observadores foram comparadas e denominadas as diferenças interobservadores. De forma semelhante, as leituras de um mesmo observador feitas para a mesma amostra, mas em corridas eletroforéticas distintas, em duplo-cego, foram comparadas e denominadas as diferenças intraobservadores. Testes estatísticos não foram necessários, como será apreciado nos resultados. Foram investigadas, caso a caso as possíveis razões para as incongruências observadas.

## 5. RESULTADOS

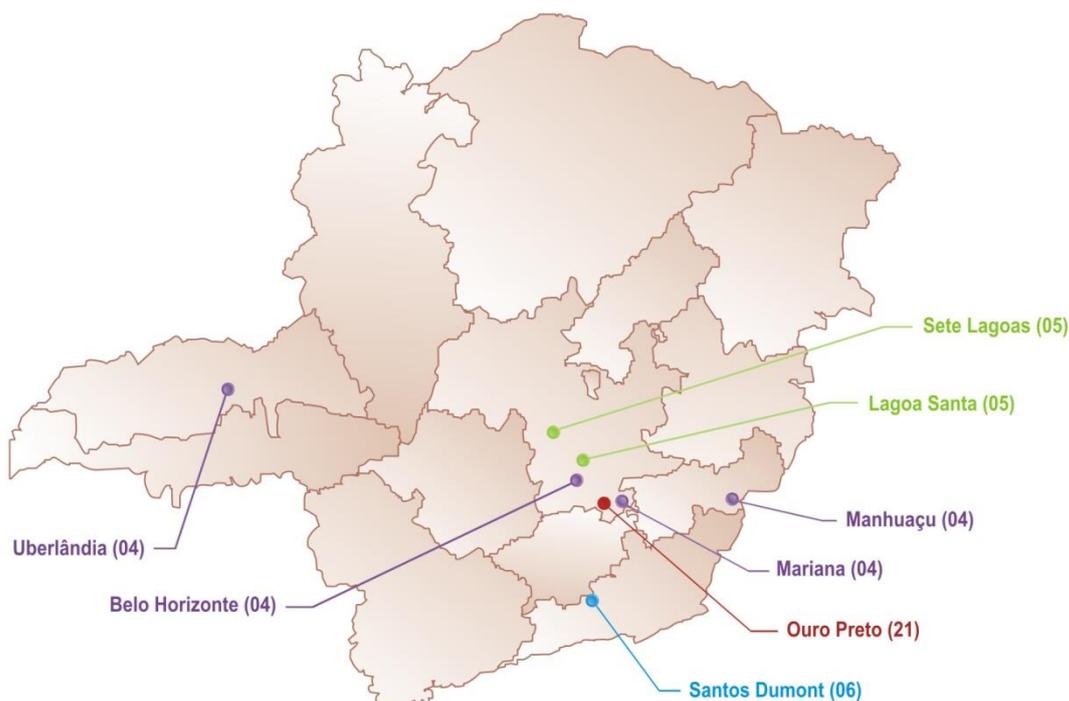
Do total de 293 crianças do PETN que apresentavam perfil eletroforético indeterminado ao nascimento e no 6º mês de vida igual ou semelhante ao da hemoglobina S, 126 crianças (43%) participaram da pesquisa. Os diferentes motivos para a não-participação das demais crianças estão relacionados na tabela 4.

**Tabela 4**  
**Motivos pelos quais não foi possível a participação de 167 crianças na pesquisa**

<b>Motivo</b>	<b>Total de casos</b>
Família convidada, mas não foi coletada amostra de sangue	94
Família não localizada	59
Família negou a participação no estudo	07
Foi coletada a amostra de sangue para a pesquisa, mas não foi assinado o termo de consentimento	06
Óbito antes da realização da pesquisa	01
<b>TOTAL</b>	<b>167</b>

### **5.1 Distribuição Geográfica, em Minas Gerais, das 126 crianças participantes da pesquisa**

A cidade onde houve o maior número de crianças portadoras da hemoglobina variante na posição da Hb S foi Ouro Preto (21 casos). A seguir, vieram Santos Dumont, com 6; Sete Lagoas e Lagoa Santa, com 5; Belo Horizonte, Manhuaçu, Mariana e Uberlândia, com 4, seguindo-se sete cidades com 3 casos, 11 com 2 casos, e 30 cidades com apenas um caso. A figura 7 apresenta o estado de Minas Gerais e a localização dos municípios com, pelo menos, 4 casos.



**Figura 7: Mapa do estado de Minas Gerais. Em destaque, as cidades onde houve pelo menos quatro casos de crianças portadoras de hemoglobina variante com corrida eletroforética na posição da Hb S.**

Notou-se em várias cidades que houve coincidência dos sobrenomes de muitas crianças. Por exemplo, na região de Ouro Preto, em 8/21 crianças pelo menos um dos sobrenomes era coincidente; em Lavras e Congonhas, municípios com três crianças participantes, os sobrenomes também se repetiram, sugerindo tratar-se de uma mesma família.

O período de nascimento das crianças estendeu-se de 10 de agosto de 1998 a 11 de junho de 2008. Das 126 crianças participantes do estudo, 75 são do gênero feminino (59,5%). A mediana da idade do recém-nascido à coleta da amostra em papel-filtro foi de 7 dias.

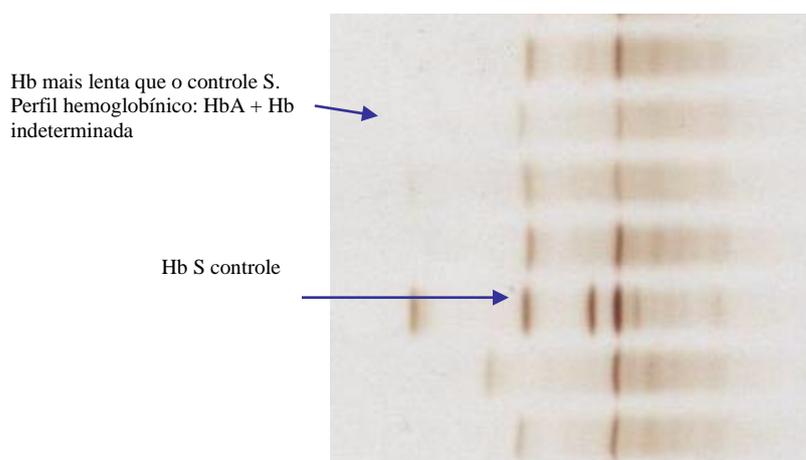
## 5.2 Eletroforese por Focalização Isoelétrica (IEF)

A tabela 5 mostra o resultado das leituras dos géis de IEF das 126 amostras realizadas em duplicata, analisadas por três observadores independentes (total de 756 leituras).

**Tabela 5**  
**Classificação da mobilidade eletroforética das hemoglobinas variantes na região da Hb S, de acordo com a leitura da IEF realizada por três observadores independentes**

Classificação da hemoglobina variante	Nº leituras	%
Hb variante mais rápida que S	429	56,7
Hb variante indistinguível de S	268	35,5
Hb variante mais lenta que S	41	5,4
Observador não emitiu opinião	18	2,4
Total	756	100,0

A interpretação conjunta das duas corridas eletroforéticas por paciente, feita pela mestranda sem conhecimento dos resultados lidos pelos três outros observadores, revelou que em 82 casos (65,1%) a Hb variante seria ligeiramente mais rápida que a Hb S, em 33 (26,2%) ela seria indistinguível da Hb S e em 11 casos (8,7%) mais lenta. A figura 8 exemplifica uma variante considerada por todos os observadores como “mais lenta” que a Hb S.



**Figura 8: Visão parcial de gel de IEF contendo Hb variante ligeiramente mais lenta que a Hb S controle; padrão hemoglobínico: Hb A + Hb variante indeterminada (seta menor, posição 2 do gel); controle AFSC (da direita para a esquerda) na posição 5 do gel de IEF; Hb S controle assinalada com a seta maior.**

A concordância nas leituras dos géis de IEF pelo mesmo observador “externo” (que não a mestranda), de uma mesma amostra, em corridas eletroforéticas distintas e em duplo cego, variou de 63,2% a 77,5%. Já a concordância nas seis leituras, pelos três observadores, foi de apenas 23,3%.

A concentração relativa das hemoglobinas variantes em heterozigose variou de 12,6% a 41,1% (média  $25,4\% \pm 4,8\%$ ). O ponto isoelétrico dessas variantes ficou entre 7,24 (hemoglobinas mais “rápidas”) a 7,31 (mais “lentas”), com média de  $7.269 \pm 0.014$  (como referência a Hb S tem o  $pI=7.28$ ). Foram retiradas desta análise as crianças com PCR positiva para a mutação S ( $n = 12$ , ver mais adiante) e as crianças com variantes em homozigose ( $n=2$ ).

### **5.3 Análise dos resultados da Cromatografia Líquida de Alta Resolução (HPLC) das amostras dos recém-nascidos com hemoglobinas variantes**

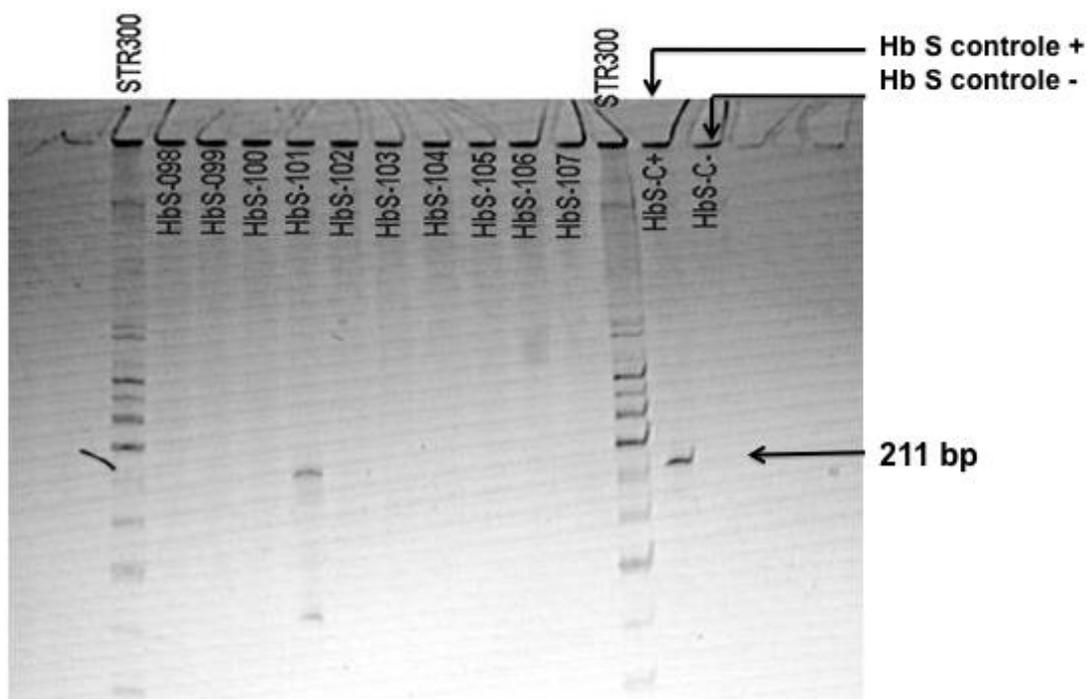
Dos 126 casos estudados, em 43 a IEF foi o único método empregado à época do nascimento da criança.

Nos outros 83 casos foi empregado o método de HPLC paralelamente com o método de IEF. Os resultados fornecidos automaticamente pelo HPLC foram recuperados no banco de dados do sistema do Nupad. Destes 83 casos, 66 resultados foram liberados automaticamente pelo aparelho, sendo: 45 resultados com o perfil “FAD”, 11 “FA” (“normal”), 7 “FAE” e 3 “FAS” (“traço falciforme”). Nos 17 casos restantes, não houve liberação automática dos resultados. A leitura retrospectiva dos achados cromatográficos registrados no sistema, realizada pela mestranda, também mostrou a predominância dos perfis FAD, FAE ou FAS.

### **5.4 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) alelo-específica para a detecção da mutação que origina a Hb S**

Em 12 casos foi detectada a presença da mutação que origina a hemoglobina S; em 114 ela foi negativa, inclusive nas crianças com homozigose para a Hb variante, bem como em seus pais, heterozigotos.

Na Figura 9, encontra-se gel representativo da amplificação de parte do gene da  $\beta$ -globina onde se localiza a mutação correspondente. Como indicado pela posição das setas, nota-se fragmento de aproximadamente 211 pb na canaleta correspondente à amostra que obteve amplificação positiva (HbS-101), da mesma forma que na canaleta do controle positivo (HbS-C<sup>+</sup>). Nas amostras negativas (-) nota-se ausência do fragmento-alvo nas canaletas correspondentes, conforme o controle negativo da reação (HbS-C<sup>-</sup>).



**Figura 9: PCR para detecção do alelo S em crianças triadas no PETN-MG. Gel de poliacrilamida corado com prata mostrando a presença do alelo S em apenas uma amostra (HbS101), além do controle positivo.**

#### 5.4.1 Estudo das doze crianças com PCR positiva para a mutação S

O quadro 6 relaciona os achados cromatográficos e eletroforéticos encontrados ao nascimento e os perfis hemoglobínicos lidos, por IEF, nas amostras colhidas para a pesquisa. Nota-se que:

- O HPLC mostrou-se sensível na identificação da hemoglobina S em 6 casos nos quais ele foi utilizado como método primário (id 1, 40, 82, 96, 152 e 266), apesar de em 3 deles o resultado não ter sido automaticamente sugerido pelo VDMS. A solicitação de nova amostra no sexto mês de vida justificou-se, em todos os seis casos, pelo achado de outras Hbs variantes pelo método de HPLC e/ou por IEF.

Em cinco destes casos (id 1, 82, 96, 152 e 266), a análise final do estudo foi de presença de traço falciforme em associação com variante de cadeia alfa. Em um caso (id 40) a associação se deu com uma variante de gama, pois houve desaparecimento completo da banda indeterminada na amostra da pesquisa. Todas as amostras da pesquisa foram colhidas após um ano de vida.

- Nos outros 6 casos em que a HPLC não era disponível à época do nascimento das crianças, a IEF da pesquisa sugere, em dois casos, traço falciforme em associação com variante de gama (id 16 e 123, semelhantes ao id 40). Em um caso (id 76) a constatação é semelhante à dos casos 1, 96, 152 e 266. Em três casos as amostras da pesquisa revelaram simples traço falciforme. Em dois destes casos, a inclusão no estudo deveu-se a que a banda S “corria” ligeiramente mais lenta que a banda S controle. Em um caso não se encontrou, retrospectivamente, razão para que fosse solicitada nova amostra no sexto mês de vida.
- Em suma, dos 12 casos positivos na PCR, em seis havia associação de traço falciforme com variante “rara” de cadeia alfa; em outras três havia associação com variante de cadeia gama, só detectável na amostra neonatal. Em três casos o diagnóstico final foi de traço falciforme, sendo justificável a solicitação de repetição do exame no sexto mês de vida em apenas dois casos, nos quais a banda S parecia “correr” mais lentamente que o controle.

**Quadro 6**  
**Análise dos 12 casos nos quais a PCR para a mutação correspondente à Hb S foi positiva**

<b>Identificação (id)</b>	<b>Hemoglobinas lidas pelo HPLC ao nascimento</b>	<b>Hemoglobinas lidas na IEF ao nascimento</b>	<b>Hemoglobinas lidas pela IEF nas amostras da pesquisa</b>	<b>Diagnóstico provável</b>
1	FAS + Desconhecida	FA + Hb na região de S + Hb indeterminada na região de C + Hb indeterminada entre S e C	AS + Hb indeterminada na região de C	<b>AS + variante de alfa</b>
96	FASD + Desconhecida	FA + Hb na região de S + Hb indeterminada na região de C + Hb indeterminada entre S e C	AS + Hb indeterminada na região de C	<b>AS + variante de alfa</b>
152	FASE	FA + Hb na região de S + Hb indeterminada na região de C + Hb indeterminada entre S e C	AS + banda muito fraca na região de C	<b>AS + variante de alfa</b>
82	FS + Desconhecida	FA + Hb na região de S + Hb indeterminada entre S e C	AS + Hb indeterminada na região de C	<b>AS + variante de alfa</b>
266	FAS (porém pico da Hb A fora do padrão de normalidade)	FA + Hb na região de S + Hb indeterminada entre S e C	AS + Hb indeterminada na região de G	<b>AS + variante de alfa</b>
40	FAS + Desconhecida	FA + Hb na região de S + Hb indeterminada entre S e C	AS	<b>AS + variante de gama</b>
16	Não havia HPLC	FA + Hb na região de S + Hb indeterminada entre S e C	AS	<b>AS + variante de gama</b>
123	Não havia HPLC	FA + Hb na região de S + Hb indeterminada entre S e C	AS	<b>AS + variante de gama</b>
76	Não havia HPLC	FA + Hb na região de S + Hb indeterminada na região de C + Hb indeterminada entre S e C	AS + Hb indeterminada na região de C	<b>AS + variante de alfa</b>
65	Não havia HPLC	FA + Hb na região de S, porém mais lenta (0,5 mm)	AS	<b>AS</b>
90	Não havia HPLC	FA + Hb na região de S, porém mais lenta (0,5 mm)	AS	<b>AS</b>
75	Não havia HPLC	FA + provável S	AS	<b>AS</b>

Como exemplo, a figura 10 mostra o cromatograma gerado pela HPLC do recém-nascido id # 40.

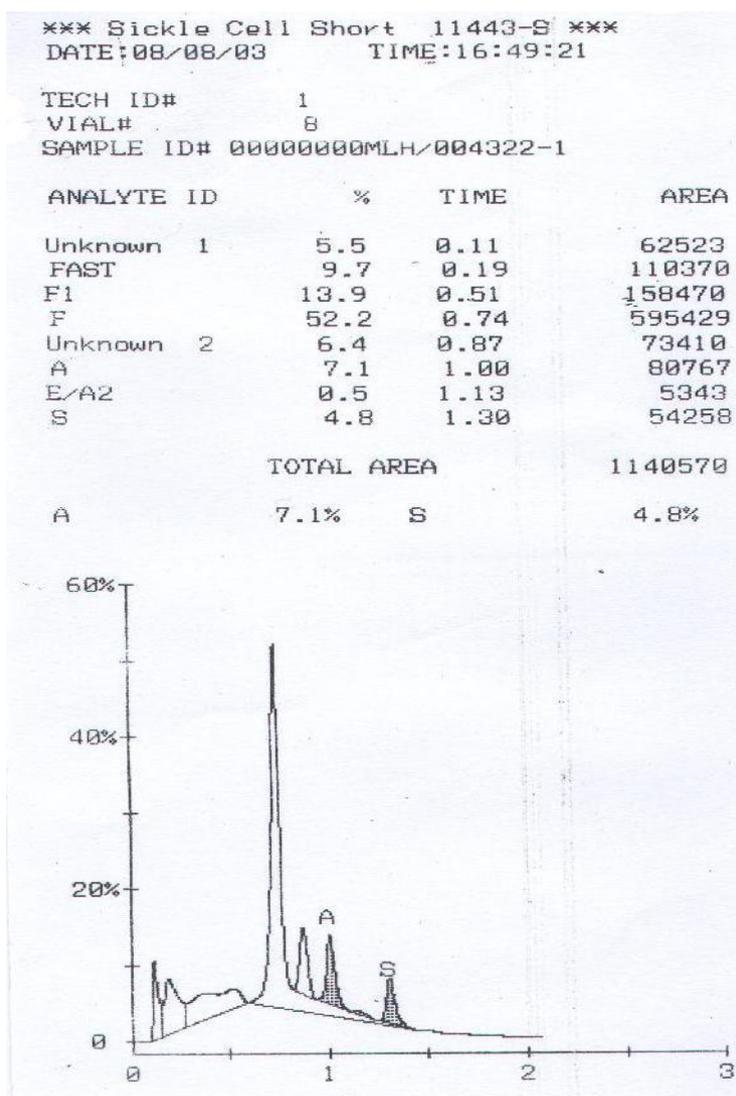


Figura 10: Cromatograma obtido pelo equipamento Variant (HPLC) da amostra de recém-nascido id # 40. Além de pequeno pico correspondente à Hb S, há um pico não identificado (*unknown*, marcado com a seta) entre a HbF e a HbA.

#### 5.4.1.1 Leitura dos géis de IEF das doze crianças com PCR positiva para a mutação S

A leitura, em duplo-cego, dos géis de IEF pelos observadores “externos” (total de  $12 \times 3 \times 2 = 72$  leituras) mostrou que em 71% (49/69) a Hb foi considerada indistinguível da Hb S controle e em 29% (20/69) mais “rápida”. Em nenhum caso ela foi considerada mais lenta do que Hb S controle. Um dos observadores não emitiu opinião sobre uma das corridas por três vezes ( $72 - 3 = 69$ ).

## **5.5 Estudo das duas crianças nas quais a hemoglobina variante encontrava-se em homozigose**

### **5.5.1 Dados epidemiológicos**

As duas crianças são do gênero feminino; uma pertencente a uma família da região de Ouro Preto (OP) e outra da região do Lago de Furnas (LF).

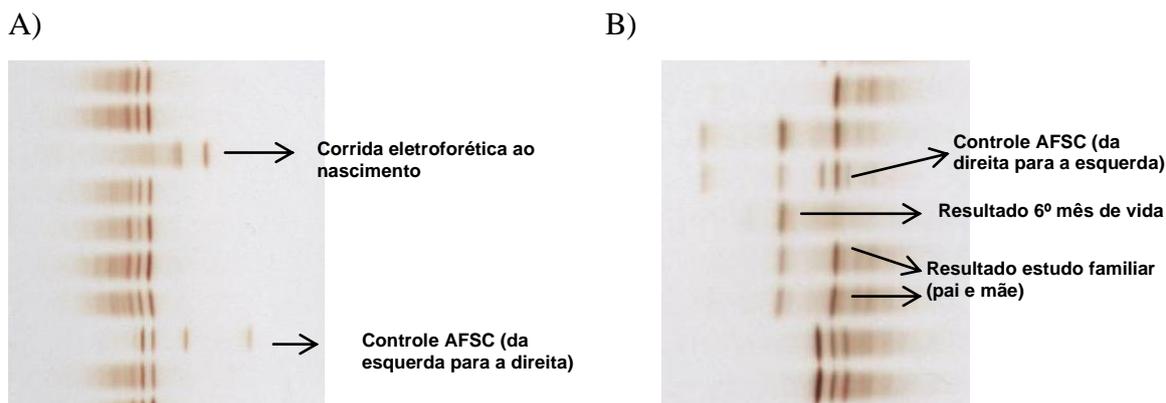
As duas famílias não possuem parentesco conhecido entre elas. A história familiar da criança OP revelou que os pais são primos, mas não sabem informar em que grau. Já a criança da região de Furnas é filha de pais em primeiro grau.

### **5.5.2 Eletroforese por Focalização Isoelétrica (IEF)**

A IEF ao nascimento de ambas as crianças evidenciou apenas duas bandas: uma com corrida eletroforética na região da Hb S e outra mais lenta que Hb S, o que justificou a solicitação da repetição do exame no sexto mês de vida.

Os perfis eletroforéticos das duas crianças no sexto mês de vida e os das amostras da pesquisa evidenciaram homozigose para hemoglobina na região da Hb S. Os perfis eletroforéticos dos pais das crianças foram compatíveis com traço para hemoglobina variante na região da Hb S (Hb A+variante indeterminada).

A figura 11 apresenta uma visão parcial do gel de IEF contendo a corrida eletroforética da criança LF com 33 dias de vida, e a corrida referente ao sexto mês de vida, conjuntamente com o estudo familiar.



**Figura 11: Visão parcial de gel de IEF; A) Corrida eletroforética da amostra ao nascimento da criança LF. B) Corrida eletroforética após o 6º mês de vida da criança LF e de seus pais.**

Na amostra colhida especificamente para a pesquisa os perfis eletroforéticos de ambas as crianças e de seus pais foram semelhantes aos encontrados por ocasião do estudo familiar.

### **5.5.3 Análise dos resultados da Cromatografia de Alta Resolução (HPLC) nas amostras dos recém-nascidos**

A análise dos resultados das cromatografias recuperadas no sistema do NUPAD (Figura 12) mostrou que em nenhum dos casos os resultados foram fornecidos automaticamente pelo método. A leitura retrospectiva dos resultados registrados no sistema mostrou que em um caso (LF) foi lido o perfil FAD e no outro caso (OP) foram lidas apenas a hemoglobina D e outras hemoglobinas não identificadas pelo método.

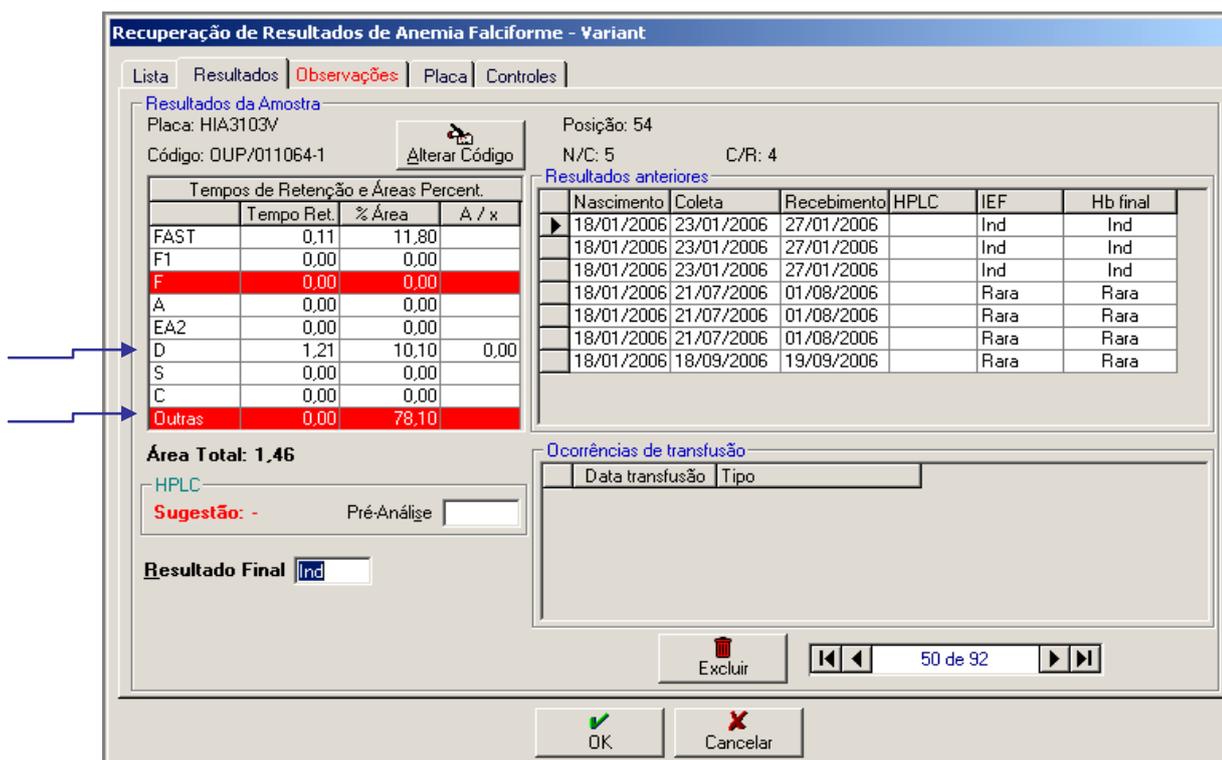
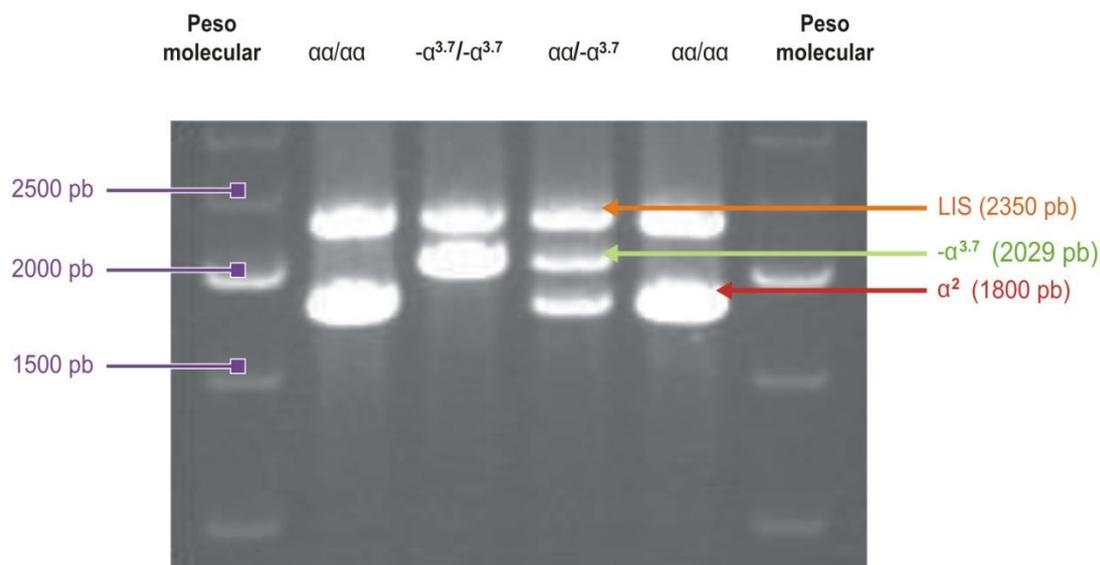


Figura 12: Visão parcial da tela de resultado da HPLC. Resultado da cromatografia registrada no sistema do Nupad, da criança OP. Presença das hemoglobinas D e de outras Hbs indeterminadas (setas).

#### 5.5.4 Realização da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para o Diagnóstico Molecular de Alfa-Talassemia

Com a técnica de PCR *multiplex* para alfa talassemia (Figura 13) identificou-se nas duas crianças a deleção de dois genes da alfa globina do tipo  $-\alpha^{3.7}$ . Portanto, o gene híbrido  $-\alpha^{3.7}$  encontrava-se em estado de homozigose nas crianças ( $-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$ ). Já os pais apresentavam o gene híbrido em heterozigose ( $\alpha\alpha/-\alpha^{3.7}$ ). Portanto, a mutação correspondente à hemoglobina variante, se localizada no gene alfa, deveria estar contida no gene híbrido  $-\alpha^{3.7}$ .



**Figura 13: PCR *multiplex* para detecção de deleções do gene da alfa globina. Gel de agarose a 1% contendo brometo de etídio, mostrando padrão genotípico normal para o gene  $\alpha$ -globina ( $\alpha\alpha/\alpha\alpha$ , canaletas 2 e 5), gene em homozigose para  $-\alpha^{3.7}$  ( $-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$ ; canaleta 3), e em estado de heterozigose ( $\alpha\alpha/-\alpha^{3.7}$ ; canaleta 4).**

### 5.5.5 Sequenciamento dos genes da beta e da alfa globina

Não se identificou mutação no gene da beta globina ao se realizar o sequenciamento dos éxons 1, 2 e 3, da criança de OP e de seus pais. A criança de LF, cronologicamente posterior a de OP, não teve seu gene beta sequenciado, pela experiência já adquirida com o caso anterior.

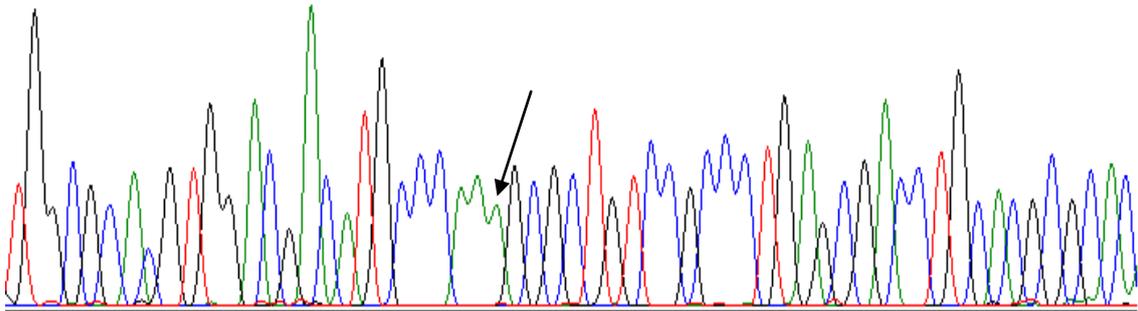
Por meio do sequenciamento do gene híbrido  $-\alpha^{3.7}$  identificaram-se em ambas as crianças uma mutação na terceira posição do códon 78, do gene  $\alpha 2$  (EF7,  $\alpha 78$  AAC>AAA; Asn>Lys), em homozigose, caracterizando a Hb Stanleyville-II.

Em todos os genitores foram detectadas as mesmas alterações, porém em heterozigose.

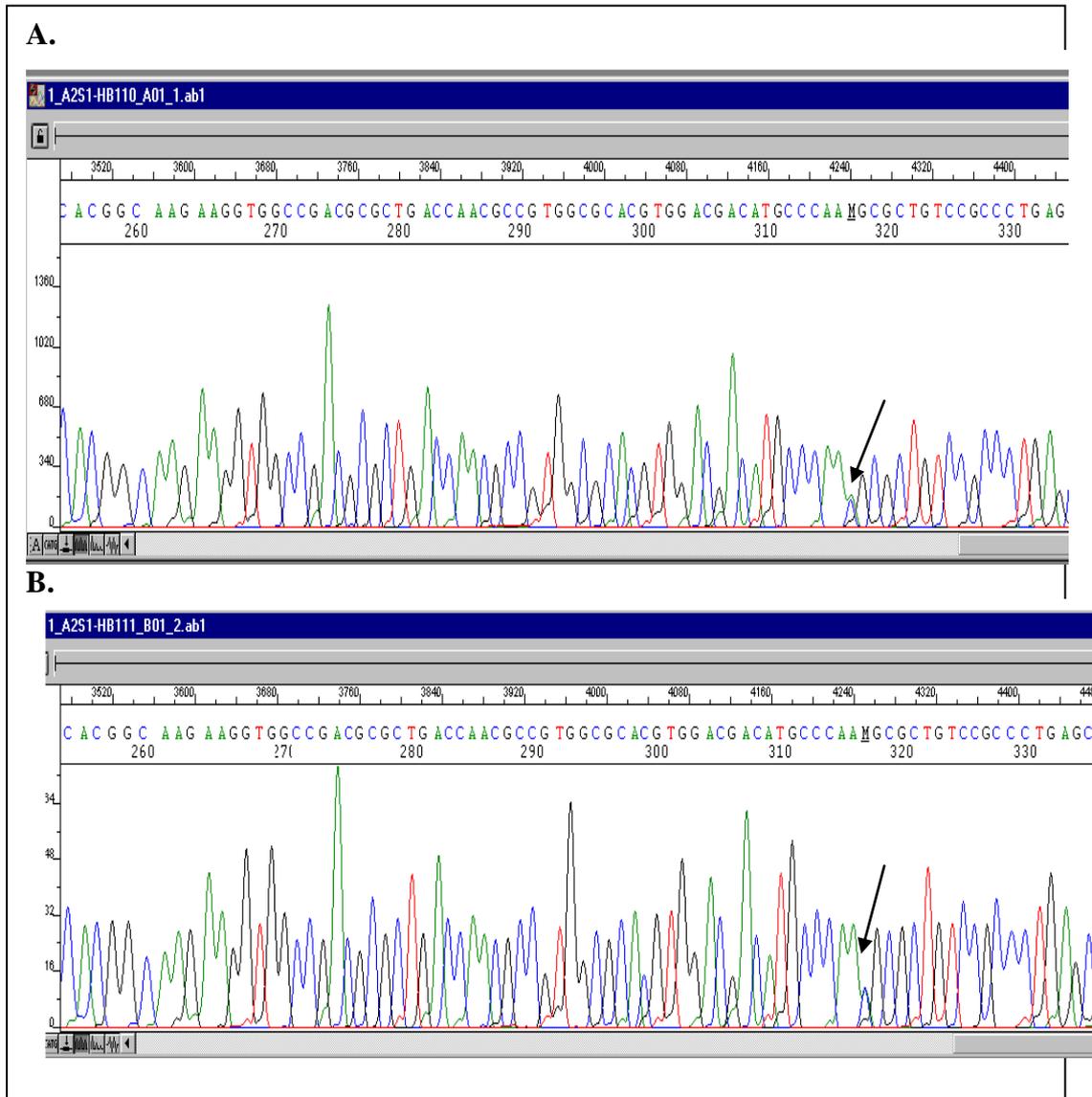
Nas figuras 14 e 15 estão ilustrados exemplos de eletroferogramas referentes ao sequenciamento.

## RESULTADOS

TGGCGC ACG TGG ACG ACA TGCCCAAAGCGC TGTCCGCCCTGAGCGACC TGCACGCGCAC  
300 310 320 330 340 350



**Figura 14. Eletroferograma correspondente ao sequenciamento do gene híbrido  $-\alpha^{3.7}$  da criança OP mostrando a mutação AAC>AAA, no códon 78, caracterizando a Hb Stanleyville-II em homozigose (seta).**



**Figura 15: Eletroferogramas correspondentes ao sequenciamento do gene híbrido  $\alpha^{3.7}$  mostrando a mutação em heterozigose. A) Pai da criança OP (seta). B) Mãe da criança OP (seta).**

A análise do segundo íntron (IVS-2) do gene híbrido mostrou que o subfragmento sequenciado correspondia ao íntron 2 do gene  $\alpha 1$ , indicando que o tipo de deleção  $\alpha^{3.7}$  correspondeu ao tipo I (Figura 16).

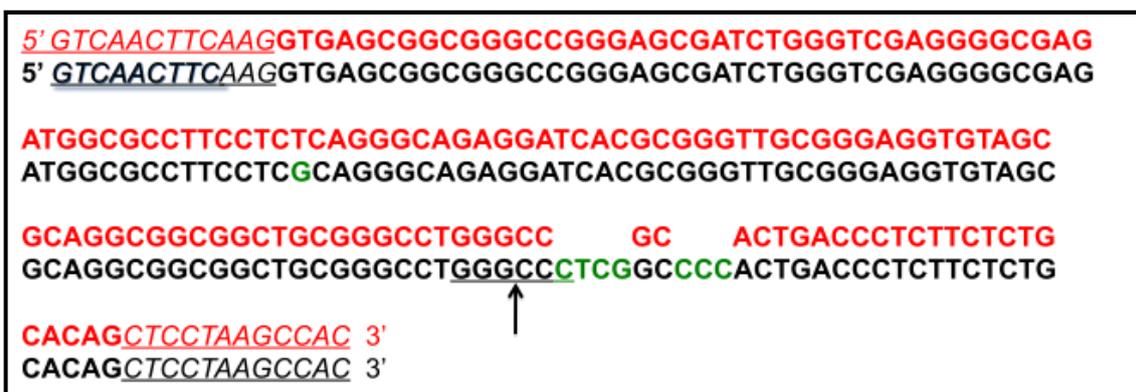


Figura 16: Sequência nucleotídica do segundo íntron (IVS-2) dos genes  $\alpha 2$  (em vermelho) e  $\alpha 1$  (em preto), para ressaltar as diferenças entre eles (em verde, nucleotídeos discordantes entre alfa1 e alfa2). Os últimos quatro códons do éxon 2 dos respectivos genes estão *em itálico* e grifados para assinalar o início das IVS-2. Da mesma forma se assinalam os quatro primeiros códons do éxon 3. Em ambas as crianças o sequenciamento revelou que o sítio de restrição ApaI (GGC↓CCC), só existente no IVS-2 do gene  $\alpha 1$ , estava presente. Portanto o *crossing over* que levou à deleção do fragmento de 3,7 kb ocorreu a 5' de ApaI, o que caracteriza a deleção 3.7 do tipo I.

### 5.5.6 Exames complementares

A análise dos dados hematológicos de ambas as crianças revelaram apenas microcitose e hipocromia.

A tabela 7 apresenta os dados hematológicos referentes às duas crianças e seus respectivos pais.

**Tabela 7**  
**Dados hematológicos das duas famílias com Hb Stanleyville-II**

	RBC (x 10 <sup>6</sup> /mm <sup>3</sup> )	Hb g/dL	Ht %	VCM fL	HCM pg	CHCM g/dL	Retic %	Ferritina ng/mL	Ferro µg/dL	HbA2 %	HbF %	Pesq Drep
<b>Família OP</b>												
<i>Pai</i>	4,65	13,4	43,5	93,5	28,8	30,8	0,2	-	-	-	-	Neg
<i>Mãe</i>	4,30	11,3	37,1	86,3	26,3	30,5	0,3	-	-	-	-	Neg
<i>Criança</i>	5,68	11,4	36,9	65,0	20,1	30,9	0,3	25	61	3,6	4,6	Neg
<b>Família LF</b>												
<i>Pai</i>	5,49	15,4	48,6	88,5	28,1	31,7	0,7	-	-	1,4	0,4	Neg
<i>Mãe</i>	5,21	13,9	44,0	84,5	26,7	31,6	0,4	-	-	1,4	0,2	Neg
<i>Criança</i>	5,04	10,9	34,1	67,8	21,7	32,0	-	19	-	-	-	-

## RESULTADOS

Sob o ponto de vista clínico, os dados hematológicos indicam que as duas crianças apresentam tão somente manifestação hematológica correspondente à alfa talassemia, com 2 genes deletados.

### 5.6 Resultados finais das crianças portadoras de hemoglobina variante na região da Hb S

A tabela 8 resume os resultados liberados pelo PETN-MG, durante a rotina do Programa, referentes às análises das amostras coletadas no 6º mês de vida, bem como os resultados encontrados nas amostras da pesquisa das 126 crianças estudadas.

**Tabela 8**  
**Resultados liberados pelo PETN-MG e resultados encontrados na pesquisa das 126**

<b>Resultado da PCR</b>	<b>Resultado encontrado na pesquisa</b>	<b>Resultado liberado na triagem neonatal durante a rotina do Programa</b>	<b>Total de casos</b>
Negativo	Hb A + Hb variante indeterminada	Hb FAS	01
		Hb AS	54
		Hb Rara	57
		Hb Stanleyville-II	Hb Rara
Positivo	Hb AS	Hb AS	03
	Hb AS + Hb variante de gama	Hb AS	03
	Hb AS + Hb variante de alfa	Hb AS	01
	AS + Hb variante de alfa	Hb Rara	05
<b>TOTAL</b>			<b>126</b>

## 6. DISCUSSÃO

### 6.1 Casuística e distribuição geográfica das crianças participantes do estudo

Não foi possível incluir no estudo 167 crianças (57%) portadoras de traço para a hemoglobina variante com corrida eletroforética na região da HbS. Observa-se que a maioria de casos não estudados refere-se a crianças cujas famílias foram contatadas, mas não aderiram à pesquisa (101 casos). Apesar de aparentemente ter sido clara e explicativa, a comunicação por telefone e por carta pode não ter levado aos responsáveis o conhecimento ou motivação suficientes sobre a importância de um diagnóstico correto. Talvez um contato pessoal tivesse sido mais produtivo, mas não era exequível pelo esforço que seria necessário e pelas limitações orçamentárias. Além disso, é importante considerar que essas crianças não apresentavam manifestações clínicas determinadas pela Hb variante, segundo informações obtidas pelo telefone. Podemos também supor, dadas as características da nossa população, que fatores socioeconômicos, não pesquisados pela mestrandia, podem ter influenciado na decisão dos pais. Em suma, a falta de conhecimento, interesse e condições socioeconômicas desfavoráveis podem ter contribuído para o índice observado.

Outro fator importante que prejudicou a participação foi a dificuldade de localização do endereço de várias crianças, apesar dos esforços adicionais realizados pelo SRTN/Nupad e por técnicos nos municípios na tentativa de localização das famílias. Devemos considerar que a grande maioria referia-se à crianças triadas há mais de cinco anos o que pode ter justificado a não-localização.

Não foi possível estabelecer o diagnóstico laboratorial definitivo de 121 crianças. Acredita-se, contudo, que o padrão hemoglobínico encontrado nas 21 crianças pertencentes ao município de Ouro Preto sugere tratar-se de uma mesma variante. Este fato pode ser reforçado pela simples observação dos sobrenomes coincidentes em algumas delas. Segundo Chinelato-Fernandes e Bonini-Domingos (2005), a população brasileira caracteriza-se por uma significativa mistura racial, apresentando intensa heterogeneidade entre suas diferentes regiões. Leoneli *et al.* (2000) relatam que a distribuição das hemoglobinas anormais está relacionada com os grupos raciais que participaram na formação da população de cada região.

## 6.2 Achados cromatográficos e eletroforéticos

A análise dos resultados das cromatografias (HPLC) das amostras de recém-nascidos mostrou que a grande maioria apresentou o perfil FAD e alguns outros, o perfil FAE. No entanto, este achado não se confirmou na análise da repetição da amostra neonatal por IEF, e nas análises das IEFs do sexto mês de vida e da pesquisa. Campbell *et al* (1999) relataram que outras variantes, inclusive algumas de cadeia gama, podem ser identificadas como HbD e HbE pelo HPLC, sendo necessária precaução na interpretação desses resultados.

Campbell *et al.* (1999) relataram, ainda, que a Hb Stanleyville-II pode sobrepor a “janela” da Hb D (mesma janela de eluição) na análise por HPLC. No presente estudo, as duas crianças homozigotas para a Hb Stanleyville-II, por ulterior sequenciamento gênico, tiveram seus resultados inicialmente classificados como de Hb D na leitura técnica, pois o equipamento “recusou-se” a liberar automaticamente os resultados, como geralmente acontece.

Realizou-se na pesquisa uma tentativa de se estabelecer um padrão de liberação do resultado do perfil hemoglobínico, pela IEF, das hemoglobinas variantes na região da Hb S, conforme as mobilidades eletroforéticas. No entanto, a análise realizada demonstrou baixa reprodutibilidade nas leituras pelos três observadores (concordância: 23,3%), mesmo sendo dois deles altamente qualificados para tal procedimento. Nota-se, ainda, que a identificação de hemoglobinas variantes ligeiramente mais lentas que a Hb S (figura 8) permite excluir a Hb S, enquanto que variantes ligeiramente mais rápidas ou indistinguíveis de S podem ser verdadeiramente S ou, então, variantes não-S. Métodos complementares devem ser utilizados para essa diferenciação. De acordo com Chinelo-Fernandes e Bonini-Domingos (2005), cada metodologia de diagnóstico apresenta limitações na identificação das hemoglobinas anormais, podendo a co-migração subestimar a frequência de algumas hemoglobinas variantes. A combinação de várias técnicas clássicas e moleculares pode ser necessária para a identificação acurada destas variantes.

No presente estudo, 12 crianças foram confirmadas pela PCR alelo-específica como sendo portadoras do gene mutante correspondente à HbS. A análise das leituras das IEFs bem como a análise das cromatografias, ao nascimento, de metade das crianças nas quais o método de HPLC havia sido utilizado como método primário, mostrou

elevada sensibilidade e especificidade dos dois métodos na detecção da HbS. Fato semelhante foi relatado por outros autores (CAMPBELL *et al.*, 1999; OU; ROGNERUD, 2001).

A análise das IEFs de 9/12 crianças portadores da HbS mostrou que as bandas detectadas ao nascimento entre as hemoglobinas S e C desapareceram nas amostras de repetição utilizadas nesta pesquisa, todas colhidas após um ano de vida. Estas variantes haviam sido classificadas, ao nascimento, como sendo variantes de cadeia gama ( $\alpha\gamma^{\text{var}}$ ). Campbell *et al.* (1999) também relataram casos semelhantes a estes. Na verdade, apenas em três dos nove casos, tratava-se, realmente, de variante de cadeia gama, pois na amostra do sexto mês de vida e na amostra colhida para a pesquisa, não mais se observava tal variante, pelo “silenciamento” fisiológico do gene gama, persistindo a banda correspondente à Hb S. Nos demais casos a interpretação é a de que, além da HbS, existiria, simultaneamente, uma variante de cadeia alfa que se expressou: a) como uma banda superposta à da HbS quando combinada com uma cadeia beta selvagem ( $\alpha^{\text{var}}\beta^{\text{A}}$ ); e b) como uma banda adicional “fraca” na posição C (5 casos) ou na G (1 caso) que representaria o dímero formado pela variante de alfa e pela HbS ( $\alpha^{\text{var}}\beta^{\text{S}}$ ).

Este estudo revelou inconsistência na liberação do resultado ao nascimento de uma criança (id 75), cujo padrão hemoglobínico (Hb FAS) já poderia ter sido definido naquele momento, mas foi julgado como indeterminado. A investigação realizada neste estudo, para se apurar o motivo da inconsistência, não encontrou falhas relativas à técnica utilizada, neste caso a IEF. O mais provável é que ocorreu uma falha na interpretação do resultado. É sabido que a interpretação dos resultados pela análise da IEF requer muita experiência, considerando que a mesma é visual, subjetiva, e utiliza como referência para a identificação das variantes apenas um controle de padrão hemoglobínico (CAMPBELL *et al.*, 1999).

Em dois casos, a hemoglobina S não foi corretamente identificada ao nascimento, devida a uma variação na corrida eletroforética de meio milímetro (0,5 mm) da posição da suposta Hb variante em relação à da Hb S controle. Esta inconsistência poderia ter sido evitada se a amostra fosse reanalisada em outro gel – o que poderia ter sido feito à época – ou por outro método, inexistente no Programa quando as crianças nasceram (2001 e 2002). Ferraz e Murao (2007) ressaltam a importância de se utilizarem dois métodos na avaliação de padrões hemoglobínicos

inconclusivos, visando a aumentar a sensibilidade e a especificidade na identificação das hemoglobinas.

Concluiu-se neste estudo que 56 crianças foram diagnosticadas incorretamente, no sexto mês de vida, como sendo portadoras do traço falciforme (Hb AS). Destas, os achados da pesquisa revelaram em 55 casos hemoglobina não-S (Hb A + variante indeterminada) e, em uma, portadora do traço falciforme em associação com variante de cadeia alfa. Ainda, cinco crianças diagnosticadas como Hb “rara” são portadoras do traço falciforme em associação com variante de cadeia alfa.

Considerando a importância de um diagnóstico laboratorial correto, todas as famílias estão sendo devidamente orientadas a fim de se esclarecer as alterações observadas. Segundo Chinelato-Fernandes e Bonini-Domingos (2005), o correto diagnóstico laboratorial é de grande importância para os indivíduos portadores de hemoglobinopatias, tendo em vista os inúmeros casos de associação de alterações de hemoglobinas, além de variantes que apresentam co-migração. O esclarecimento do diagnóstico é fundamental, tanto para a correta orientação genética, quanto para se evitarem tratamentos inadequados ou desnecessários dos seus portadores.

### **6.3 Hemoglobina Stanleyville-II**

A hemoglobina Stanleyville-II foi descrita pela primeira vez em 1959, em duas famílias do nordeste de Congo, fronteira do Sudão, em Stanleyville, hoje chamada Kisangani, cidade pertencente à República Democrática de Congo. Uma das famílias pertencia à tribo Budu, de língua Bantu, vivia no nordeste do Congo Belga e era rodeada pela tribo Nilote. A outra família era oriunda do nordeste de Congo, na região do rio Uele, cuja população é originada de uma mistura das tribos Bantu-Nilote. A descoberta da Hb Stanleyville-II se deu pelo estudo do sangue de quatro indivíduos, sendo a mãe e um filho de cada família. A eletroforese no papel de amido em pH alcalino mostrou além da hemoglobina A, uma outra fração indistinguível das hemoglobinas Hb S e D. Estas frações foram indistinguíveis da Hb A pela eletroforese em pH ácido. O teste de falcização foi negativo e a Hb variante foi denominada Stanleyville-II (DHERTE *et al.*, 1959).

A 400 km de Stanleyville, foi descrito outro caso de Hb Stanleyville-II, também em heterozigose, com as mesmas características na eletroforese alcalina e ácida. Foi

possível visualizar outra fração de Hb A<sub>2</sub>, mais lenta que a A<sub>2</sub> “normal”, provavelmente composta de cadeia alfa com a mutação Stanleyville-II mais a cadeia δ normal. O estudo identificou ainda, através da técnica de “*fingerprint*”, a substituição do aminoácido asparagina por lisina, no códon 78 da cadeia alfa. Como essa substituição ocorre em uma região não-helicoidal entre as hélices E e F (EF7), na superfície da molécula da hemoglobina, sem contato com o grupo heme ou com outra cadeia de globina, os autores previram, acertadamente, que a hemoglobina variante não traria consequências clínicas (VAN ROS *et al.*, 1968). Este achado foi confirmado posteriormente no estudo de González *et al.* (2008). Esta substituição envolve a troca de um aminoácido eletricamente neutro (asparagina) por outro aminoácido eletricamente positivo (lisina) na superfície externa da estrutura terciária da cadeia da globina, no segmento EF, provocando apenas uma variação na carga da cadeia. A localização da mutação não interfere na estabilidade, solubilidade ou afinidade pelo oxigênio do tetrâmero da globina, justificando a ausência de manifestações clínicas.

A hemoglobina Stanleyville-II (Hb StaII) também foi descrita em associação com a anemia falciforme em homozigose, com a talassemia  $\alpha^{3.7}$ , e em associação com o traço para a anemia falciforme (COSTA *et al.*, 1987; COSTA *et al.*, 1991; WENNING *et al.*, 2000; RHODA *et al.*, 1983; SERJEANT *et al.*, 2005, KIMURA *et al.*, 2008) e, recentemente, em associação com uma nova variante descrita em Campinas, Brasil, a Hb Campinas (KIMURA *et al.*, 2008),

Há evidências de que a mutação  $\alpha_2^{78}$  interferiria nas relações intermoleculares na ocorrência da combinação Hb Stanleyville-II/Hb S ( $\alpha_2^{78 \text{ Asn}>\text{Lys}}\beta_2^{6 \text{ Glu}>\text{Val}}$ ). Esta mutação desempenharia um importante papel na estabilização da formação de fibras, modificando as propriedades das formas oxi e deoxi da variante falciforme, levando à diminuição da polimerização da hemoglobina e conseqüentemente a um achado clínico semelhante à Hb S no estado de heterozigose (RHODA *et al.*, 1983; NORTH *et al.*, 1980). Entretanto, os achados clínicos e hematológicos de um paciente de Costa *et al.* (1987) não confirmaram tal hipótese.

A Hb Stanleyville-II já foi descrita, além do Congo, em populações da Uganda, Zaire, Texas (USA), Alsácia (França) e, também no Brasil, como referido anteriormente. De acordo com os dados do *Globin Gene Server*, a Hb Stanleyville-II seria caracterizada pela troca de uma base única no códon 78 dos genes  $\alpha_1$  ou  $\alpha_2$  (AAC>AAG), resultando na substituição da asparagina pela lisina (EF7,  $\alpha_78$

Asn>Lys), mas não foram encontrados estudos nos quais é baseada esta informação (C>G). Os estudos consultados demonstram que a substituição nucleotídica envolvida na mutação é AAC>AAA ( $\alpha 78$  Asn>Lys), na cadeia  $\alpha 2$  (COSTA *et al.*, 1987; DODÉ *et al.*, 1990; WENNING *et al.*, 2000; WAITUMBI *et al.*, 2007; DRAUBE *et al.*, 2007; GONZÁLEZ *et al.*, 2008).

Costa *et al.* (1987) descreveram o estudo de duas famílias brasileiras com Hb Stanleyville-II associada à  $\alpha$  talassemia (gene em cis). Um dos pacientes foi o primeiro caso descrito de homozigose tanto para Hb Stanleyville como para Hb S. Tratava-se de uma garota brasileira de quatro anos de idade, negra, apresentando quadro clínico compatível com doença falciforme, além de microcitose e hipocromia. O teste de falcização foi positivo, inclusive nos pais. A eletroforese em acetato de celulose, pH alcalino, mostrou uma banda de Hb F ( $\alpha_2^{\text{Sta}}\gamma_2$ ), uma banda da Hb híbrida S/Sta II, migrando na região da Hb A<sub>2</sub>, e uma banda da Hb A<sub>2</sub> variante ( $\alpha_2^{\text{Sta}}\delta_2$ ) ainda mais lenta que a Hb A<sub>2</sub> “normal”. Já a eletroforese dos pais mostrou quatro frações de hemoglobina, migrando nas posições da Hb A, da Hb S, da Hb A<sub>2</sub> “normal” e uma fração ainda mais lenta que esta. O padrão eletroforético em pH ácido mostrou Hb S em homozigose para a criança e em heterozigose para os seus pais.

A análise dos aminoácidos de cada uma das cadeias de globina pelo “*fingerprint*” mostrou na cadeia alfa a substituição da asparagina pela lisina ( $\alpha 78$  Asn>Lys), confirmando a Hb Stanleyville-II, e, na cadeia beta, a substituição do ácido glutâmico pela valina (Glu>Val), confirmando a dupla homozigose Hb S/StaII na criança ( $\alpha_2^{\text{Sta}}\beta_2^{\text{S}}$ ). A quantificação da síntese das cadeias de globina mostrou que a razão entre a produção de cadeias alfa/não-alfa variou entre 0,59 a 0,77 nos diversos indivíduos estudados, confirmando a hipótese de alfa-talassemia. Como não foram encontradas cadeias  $\alpha$  ou  $\beta$  normais no “propositus”, os autores concluíram que a dupla homozigose para as duas variantes só seria possível na associação da  $\alpha$  talassemia em cis com a  $\alpha$  Stanleyville-II. Isso foi demonstrado no trabalho subsequente (COSTA *et al.*, 1991), usando enzimas de restrição que definiram o estado de heterozigose para a deleção do tipo 3.7 nos pais e na irmã e de homozigose no “propositus”.

No segundo caso, mulher de 20 anos, brasileira, negra, a Hb Stanleyville-II constituía 35% do total das cadeias alfa produzidas e, pelo mesmo raciocínio, a mutação deveria estar em cis com a deleção de um gene alfa.

Dodé *et al.* (1990), através da utilização de técnicas moleculares para análise das mutações da alfa globina humana, estudaram o DNA de um indivíduo negro, do Zaire (atual República Democrática de Congo), e demonstraram uma homozigose para anemia falciforme em associação com Hb Stanleyville-II, na ausência de alfa talassemia. Os genes  $\alpha 1$  e  $\alpha 2$  foram sequenciados e verificou-se que a mutação envolvia o éxon 2 do gene  $\alpha 2$ : AAC > AAA (Stanleyville-II,  $\alpha_2^{78Lys}$ ).

Serjeant *et al.* (2005), durante o estudo de 100 pacientes com doença falciforme em Uganda, identificaram em dois deles um padrão eletroforético compatível com hemoglobinopatia SC. Uma investigação mais detalhada mostrou tratar-se de hemoglobina S em homozigose associada com Hb Stanleyville-II em heterozigose. A fração que se assemelhava à Hb C, na verdade, era a hemoglobina híbrida  $\alpha_2^{Sta}\beta_2^S$ .

North *et al.* (1975) descreveram a Hb Stanleyville-II em uma família que vivia na Alsácia, região da França. As características eletroforéticas não se distinguiam do que já foi até aqui referido. A fração representava 24% da hemoglobina total na garota de 8 anos, “propositus” do estudo. A mãe e cinco dos sete irmãos da criança também eram portadores da Hb variante. Pelo método de “*fingerprint*” verificou-se que havia troca da asparagina pela lisina, no códon 78 (EF7) da cadeia alfa.

Wenning *et al.* (2000) analisaram 27 pacientes com hemoglobinopatias estruturais de cadeia alfa, sendo quatro deles (3 negros e um caucasiano) heterozigotos para a Hb Stanleyville-II em associação com a talassemia  $\alpha^{3.7}(-\alpha^{Stanleyville})$  e sem co-herança da Hb S. Eles apresentavam microcitose e hipocromia, provavelmente devidas à associação com a  $\alpha$ - talassemia. O padrão eletroforético foi similar ao já descrito. A ocorrência da mutação foi confirmada por sequenciamento sendo a substituição nucleotídica AAC > AAA ( $\alpha 78 Asn > Lys$ ), na cadeia  $\alpha 1$ .

González *et al.* (2008) descreveram o primeiro caso da Hb Stanleyville-II na Espanha, sendo este o segundo caso em uma pessoa não-negra na literatura médica. O estudo mostrou que, pela eletroforese em acetato de celulose em pH alcalino e pela focalização isoelétrica, a Hb variante se comportava de forma semelhante à hemoglobina S. No entanto, a mesma não se separava da Hb A pela eletroforese em ágar citrato de pH ácido. O estudo molecular da cadeia alfa através de sequenciamento mostrou a mutação AAC > AAA, em heterozigose, no códon 78 do segundo éxon da gene  $\alpha 2$ , determinando a substituição da asparagina pela lisina.

#### 6.4 Hb Stanleyville II em associação com a deleção $-\alpha^{3,7}$

A variante identificada como Hb Stanleyville-II apresentou mobilidade eletroforética na posição da hemoglobina S, por IEF, em ambas as crianças. Este achado foi relatado também em outros estudos (SERJEANT *et al.*, 2005; GONZÁLEZ *et al.*, 2008). Outros trabalhos também relataram a ocorrência deste achado na eletroforese com pH alcalino (DHERTE *et al.*, 1959; VAN ROS *et al.*, 1968; GONZÁLEZ *et al.*, 2008).

Para a identificação da hemoglobina variante em homozigose, iniciou-se o sequenciamento pelo gene  $\beta$ , uma vez que a amostra da pesquisa, bem como a do sexto mês de vida, mostravam, à IEF, uma única banda na posição da HbS. Segundo Kimura *et al.* (2008) a maioria das mutações ocorre na cadeia beta. Hocking (1997) relatou que uma variante de cadeia  $\alpha$  só seria encontrada na proporção de 33% e de 50% do total de hemoglobina, na presença da deleção de um e de dois genes  $\alpha$ , respectivamente. Não se atentou, à época em que se tomou esta decisão, que a IEF de nascimento não sugeria a hipótese de variante de cadeia  $\beta$ , pois não existia nenhuma banda de hemoglobina na posição habitual ocupada pelo dímero  $\alpha\gamma$  (Hb F selvagem). Retrospectivamente, identificada a variante como Stanleyville-II, a IEF ao nascimento deve ser interpretada da seguinte forma: a) a primeira banda (mais anódica) representa a justaposição do dímero  $\alpha^{\text{Stanley}}\beta^{\text{A}}$  e da fração acetilada  $\alpha^{\text{Stanley}}\gamma$ ; b) a segunda banda, de maior concentração que a anterior e entre as posições ocupadas pelas HbS e HbC controles, representa o dímero  $\alpha^{\text{Stanley}}\gamma$ . Analisada com atenção, também não seria possível tratar-se, na amostra do recém-nascido, de variante de cadeia  $\gamma$  ( $\gamma^{\text{var}}$ ), pois, nesse caso, teria de ser observada uma banda na posição da HbA ( $\alpha\beta^{\text{A}}$ ), o que não era o caso. O sequenciamento do gene  $\beta$  teria de ser, como realmente aconteceu normal. Claro que ele afastou a possibilidade de uma variante simultânea de cadeia  $\beta$ , deixando claro que a mutação teria de se localizar no gene  $\alpha$ .

Para explicar o achado de uma variante em homozigose, havia, então, duas hipóteses: a) homozigose para alelos deletoriais de  $\alpha$ -talassemia ( $-\alpha^{3,7}$  ou  $-\alpha^{4,2}$ ) que contivessem, simultaneamente, uma mutação para a Hb variante; b) um alelo contendo deleção de dois genes  $\alpha$  ( $--$ ; ou  $\alpha^0$ ) e outro contendo os genes  $\alpha_2$  e  $\alpha_1$ , ambos apresentando a mesma mutação correspondente à síntese da Hb variante. Claro que a

primeira hipótese era a mais provável, pois cromossomas  $\alpha^0$  são incomuns no Brasil, diferentemente da elevada proporção de cromossomas  $-\alpha^{3.7}$  (CANÇADO, 2006; SOUZA *et al.*, 2009).

O sequenciamento do gene  $\alpha$  identificou uma mutação de um único nucleotídeo (AAC>AAA, códon 78, Asn>Lys), caracterizando a Hb Stanleyville-II, associada à alfa talassemia (gene em cis) no estado de homozigose ( $-\alpha^{3.7, Stanley}/-\alpha^{3.7, Stanley}$ ). Até o momento, não encontramos nenhuma publicação com a ocorrência desta combinação em homozigose ( $-\alpha_2^{3.7, Stanley}/\beta_2$ ). No entanto, há outros relatos da associação da Hb Stanleyville-II com deleção  $-\alpha^{3.7}$ , inclusive no Brasil (COSTA *et al.*, 1987; WENNING *et al.*, 2000). Num dos casos de Costa *et al.* (1987 e 1991), a criança apresentava dupla homozigose para Hb Stanleyville-II e HbS ( $-\alpha_2^{3.7, Stanley}/\beta_2^S$ ). Ambos os pais apresentavam heterozigose para Hb Stanleyville-II e Hb S (COSTA *et al.*, 1991).

Segundo dados do Globin Gene Server (2010), a Hb Stanleyville-II é caracterizada pela troca na terceira base do códon 78 (AAC>AAG; C>G) no gene  $\alpha 1$  ou no  $\alpha 2$ . No presente estudo o sequenciamento identificou a troca da base C>A (AAC>AAA), sendo esta troca relatada também por outros autores que utilizaram o sequenciamento (DODÉ *et al.*, 1990; WENNING *et al.*, 2000; WAITUMBI *et al.*, 2007; DRAUBE *et al.*, 2007; GONZÁLEZ *et al.*, 2008). Tanto a mutação descrita no Globin Gene Server (C>G) como a mutação achada neste e em outros estudos (C>A) geram a substituição da asparagina pela lisina, pois ambos os códons AAG e AAA codificam o aminoácido lisina.

A análise do sequenciamento do gene híbrido  $\alpha^{3.7}$  mostrou que a mutação da Hb Stanleyville-II, no presente estudo, ocorreu, em ambas as crianças, no segmento correspondente ao gene  $\alpha 2$ , assim como no estudo de Dodé *et al.* (1990), Draube *et al.* (2007), Waitumbi *et al.* (2007) e González *et al.* (2008). Já Wenning *et al.* (2000) identificaram a mutação da Hb Stanleyville-II como localizada no gene  $\alpha 1$  (tabela 2 do referido artigo). Provavelmente trata-se de um equívoco, pois em todos os quatro casos a mutação AAC>AAA estava associada, segundo os autores, com a deleção alfa do tipo 3.7 e, portanto, forçosamente, a referida mutação estava situada no segmento  $\alpha 2$  do gene híbrido, pois nos três tipos de deleção  $-\alpha^{3.7}$  o éxon 2 do gene  $\alpha 1$  encontra-se no fragmento que é perdido durante o *crossing-over* que deu origem ao gene híbrido. Essa interpretação é confirmada por uma *Brief Communication*, publicada no periódico Acta Haematologica pelo mesmo grupo de pesquisadores (WENNING *et al.*, 1999), no relato

das bases moleculares de quatro hemoglobinas variantes no Brasil, entre elas a Hb Stanleyville-II.

O relato de Ostendorf *et al.* (2005) de que a mutação estaria localizada no gene  $\alpha 1$  não se sustenta quando se verifica que o *primer* reverso (denominado no artigo BHB1: 5' cca ttg ttg gca cat tcc ggg aya 3', onde y é c ou t) utilizado na amplificação genômica para posterior sequenciamento é específico para o gene  $\alpha 2$ , conforme se pode constatar na sequência do NCBI NG\_000006.1. Em conclusão, não foi encontrada, em nenhum dos artigos extraídos da base PubMed, evidência incontestada de a mutação que gera a Hb Stanleyville-II poder também ser encontrada no gene  $\alpha 1$  e, mais ainda, nenhuma referência a que a mutação pudesse ser AAC>AAG. A informação constante do *Globin Gene Server* deve ser, portanto, retificada.

A análise dos dados hematológicos encontrados neste estudo revelou que as duas crianças não apresentam clínica associada à mutação. Como já foi relatada por outros autores, a ausência de clínica justifica-se pelo fato de a substituição nucleotídica, que caracteriza a Hb Stanleyville-II, ocorrer em uma região que não interfere na estabilidade, solubilidade ou afinidade pelo oxigênio do tetrâmero da globina (VAN ROS *et al.*, 1968; GONZÁLEZ *et al.*, 2008). No entanto, as duas crianças, como esperado, apresentaram alterações hematológicas correspondentes à deleção  $-\alpha^{3,7}$  em homozigose. O mesmo foi também observado pelos autores que estudaram esta associação em brasileiros (COSTA *et al.*, 1987; WENNING *et al.*, 2000).

### **6.5 Contribuição para o aprimoramento do protocolo de liberação dos resultados de hemoglobinopatias pelo PETN-MG**

Com as análises realizadas neste estudo pode-se inferir que há grande chance de que uma variante com corrida eletroforética na região da S, em amostras do sexto mês de vida, seja de cadeia alfa, toda vez que a IEF da amostra neonatal houver revelado uma fração indeterminada na região da Hb S e uma fração indeterminada entre as hemoglobinas S e C, e esta última “desaparecer” na amostra do 6º mês de vida (provável  $\alpha^v\gamma$  ao nascimento).

A diferenciação da Hb S de outras variantes poderia ser realizada através do teste de falcização (pesquisa de drepanócitos) no sexto mês de vida, desde que se observassem as condições necessárias para se evitarem falso-negativos e falso-positivos.

Deve-se considerar que programas de triagem neonatal de grande amplitude, como a do PETN-MG, podem enfrentar dificuldades quanto à possibilidade de inadequação das amostras devido ao tempo decorrido entre a coleta e o recebimento do sangue pelo laboratório e/ou a possibilidade do transporte inadequado. Deve-se considerar, ainda, que o programa trabalha com papel-filtro e haveria necessidade de se introduzir, nos casos duvidosos, um protocolo para a coleta de sangue em EDTA, o que representa custos adicionais ao Programa.

Em todos os casos em que a amostra neonatal revelou padrão hemoglobínico indeterminado e a amostra do sexto mês Hb variante na região da HbS, observou-se que a inclusão do método de PCR alelo-específica para a mutação S permitiu a diferenciação da Hb S das variantes não-S na totalidade dos casos. Deve-se considerar que a técnica é específica e utiliza amostra colhida em papel filtro, o que constitui grande vantagem para o Programa e deve, na nossa opinião, ser incorporado à rotina de liberação dos resultados nesses casos.

Pelo potencial de manifestações clínicas subsequentes, os casos de homozigose ao nascimento devem ter uma abordagem especial, com utilização de métodos moleculares para identificar a hemoglobina variante.

## 7. CONCLUSÕES

Com base nos resultados deste estudo pode-se concluir que:

- A PCR alelo-específica permitiu a diferenciação diagnóstica entre a hemoglobina S e as variantes com corrida eletroforética na região da Hb S.
- A concentração de casos de crianças com hemoglobinas variantes, eletroforeticamente semelhantes à Hb S, e com sobrenomes semelhantes no município de Ouro Preto sugere uma única hemoglobina variante.
- A IEF e o HPLC apresentam limitações na identificação das hemoglobinas anormais com migração semelhante à da Hb S quando a amostra de portadores de tais hemoglobinas é colhida após o período neonatal (“perfil adulto”).
- O conjunto das análises por IEF e HPLC sugere que a maioria das hemoglobinas variantes do presente estudo são devidas a alterações de cadeia alfa.
- A adoção de métodos moleculares foi imprescindível na identificação da hemoglobina Stanleyville-II (AACC>AAAA, códon 78, Asn>Lys) e da deleção da talassemia  $-\alpha^{3.7}$  tipo I, ambas em homozigose, em duas crianças do presente estudo; os pais são heterozigotos para ambas as alterações.
- As duas crianças portadoras da Hb Stanleyville-II ( $-\alpha^{3.7, Stanley}/-\alpha^{3.7, Stanley}$ ) apresentam microcitose e hipocromia associadas tão somente à talassemia  $-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$ .
- A adoção de métodos complementares e/ou moleculares nos programas de triagem neonatal é imprescindível para esclarecimento do diagnóstico laboratorial das hemoglobinas variantes com perfil eletroforético semelhante à Hb S, quando na amostra neonatal o perfil hemoglobínico é indeterminado e na amostra do sexto mês de vida apresenta hemoglobina na região da Hb S.

## *CONCLUSÕES*

---

- O presente estudo contribuiu para o aprimoramento do protocolo de liberação de resultados utilizado no Programa Estadual de Triagem Neonatal de Minas Gerais.

## 8. REFERÊNCIAS

Adorno EV, Couto FD, Moura Neto JP, Menezes JF, Rego M, Reis MG, Gonçalves MS. Hemoglobinopathies in newborns from Salvador, Bahia, Northeast Brazil. *Cad Saúde Pública*. 2005; 21(1):292-8.

Araújo MCPE, Serafim ESS, Castro Jr WAP, Meeiros TMD. Prevalência de hemoglobinas anormais em recém-nascidos da cidade de Natal, Rio Grande do Norte, Brasil. *Cad Saúde Pública*. 2004; 20(1):123-8.

Ballas SK. Effect of alpha-globin genotype on the pathophysiology of sickle cell disease. *Pediatr Pathol Mol Med*. 2001; 20(2): 107-21.

Basset P, Beuzard Y, Garel MC, Rosa J. Isoelectric Focusing of Human Hemoglobin: It Application to Screening, to the Characterization of 70 Variants, and to the Study of Modified. *Blood*. 1978; 51(5):971-82.

Beresford CH, Clegg JB, Weatherall DJ. Haemoglobin Ocho Rios ( $\beta$ 52 (D3) Aspartic Acid $\rightarrow$ Alanine): a new  $\beta$ -Chain variant of Haemoglobin A found in combination with Haemoglobin S. *J Med Genet*. 1972; 9:151-3.

Bertholo LC, Moreira HW. Focalização isoeétrica na identificação das hemoglobinas. *J Bras Patol Med Lab*. 2006; 42(3):163-8.

Bezerra MAC, Albuquerque DM, Santos MAA, Kimura EM, Jorge SEDC, Oliveira DM, *et al*. Two new unstable haemoglobins leading to chronic haemolytic anaemia: Hb Caruaru [( $\beta$ 122(GH5)Phe $\rightarrow$ Ser], a probable case of germ line mutation, and Hb Olinda [ $\beta$ 22 (B4) – 25 (B7)], a deletion of a 12 base-pair sequence. *Eur J Haematol*. 2009; 83(4):378-82.

Bio-Rad Laboratories. VARIANT™ Sickle Cell Short Program. Gladesville NSW: Bio-Rad; 2005. L70012005PT00

Bowden DK, Hill AVS, Higgs DR, Oppenheimer JS, Weatherall DK, Clegg JB. Different hematologic phenotypes are associate with the leftward ( $-\alpha^{4,2}$ ) and Rightward ( $-\alpha^{3,7}$ )  $\alpha^+$ -Thalassemia deletions. *J Clin Invest*. 1987; 79:39-43.

Bowman BH, Oliver CP, Barnet DR, Cunningham JE, Schneider RG. Chemical characterization of three Hemoglobins G. *Blood*. 1964; 3(2):193-9.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Especializada. Portaria Nº 386 de 19 set. 2001. Manual de normas técnicas e rotinas operacionais do programa nacional de triagem neonatal. 2ª ed. Brasília: Editora do Ministério da Saúde; 2005.

Campbell M, Henthron JS, Davies SC. Evaluation of cation-exchange HPLC compared with isoelectric focusing for neonatal hemoglobinopathy screening. *Clin Chem*. 1999; 45(7):969-75.

- Cançado RD. Talassemias alfa. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2006; 28(2):81-7.
- Chinelato-Fernandes AR, Bonini-Domingos CR. Contribuição do estudo molecular de hemoglobinas S-like para o conhecimento da diversidade genética da população brasileira. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2005; 27(3):208-12.
- Chong SS, Boehm CD, Higgs DR. A rapid and reliable 7-deletion multiplex polymerase chain reaction assay for  $\alpha$ -thalassemia. *Blood.* 2000a July; 98(1):250-1.
- Chong SS, Boehm CD, Cutting GR, Higgs DR. Simplified multiplex-PCR diagnosis of common Southeast Asian deletional determinants of  $\alpha$ -thalassemia. *Clin Chem.* 2000b Oct; 46(10):1692-5.
- Chong SS, Boehm CD, Higgs DR, Cutting GR. Single-tube multiplex-PCR screen for common deletional determinants of  $\alpha$ -thalassemia. *Blood.* 2000c Jan 1; 95(1):360-2.
- Colah RB, Surve R, Sawant P, D'Souza E, Italia K, Phanasgaonkar S, Nadkarni AH, Gorakshakar AC. HPLC Studies in Hemoglobinopathies. *Indian J Pediatr.* 2007 July; 74(7):657-62.
- Costa FF, Sonati MF, Zago MA. Hemoglobin Stanleyville II ( $\alpha$ 78 Asn→Lys) is associated with a 3.7-kb  $\alpha$ -globin gene deletion. *Hum Genet.* 1991; 86:319-20.
- Costa FF, Zago MA, Sonati MF, Bottura C. The association of Hb Stanleyville-II with thalassemia and Hb S. *Nouv Rev Fr Hematol.* 1987; 29:387-90.
- Daudt LE, Zechmaister D, Portal L, Camargo Neto E, Silla LMR, Giugliani R. Triagem neonatal para hemoglobinopatias: um estudo piloto em Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. *Cad Saúde Publica.* 2002; 18(3):833-41.
- Delanoe-Garin J, Blouquit Y, Arous N, Lacombe C, Vainchenker W, Rosa J, Galacteros F. Hb Kokura alpha 247 (CE5) Asp---Gly beta 2 in a French Jewish family. *Nouv Rev Fr Hematol.* 1986; 28(5):321-2.
- Dherte P, Vandepitte J, Ager AJM, Lehamann H. Stanleyville I and II. *Br Med J.* 1959; 2(5147):282-4
- Diniz D, Guedes C, Barbosa L, Tauil PL, Magalhães I. Prevalência do traço e da anemia falciforme em recém-nascidos do Distrito Federal, Brasil, 2004 a 2006. *Cad Saúde Pública.* 2009; 25(1):188-94.
- Dodé C, Rochette J, Krishnamoorthy R. Locus assignment of human  $\alpha$  globin mutations by selective amplification and direct sequencing. *Br J Haematol.* 1990; 76:275-81.
- Draube A, Chemnitz JM, Wickenhauser C, Staib P, Hallek M, Kreuzer KA. Cytomorphologic signs of severe pernicious anemia obscured in a patient with heterozygous hemoglobin Stanleyville II. *Eur J Haematol.* 2007; 79(4):360-2.
- Embury SH, Hebbel RP, Mohandas N, editors. *Sickle cell disease: Basic principles and clinical practice.* New York: Raven Press; 1994. p. 509-15.

Ferraz MHC, Murao M. Diagnóstico laboratorial da doença falciforme em neonatos e apos o sexto mês de vida. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2007; 29 (3):218-22.

Frenette PS, Atweh GF. Sickle cell disease: old discoveries, new concepts, and future promise. *J Clin Invest.* 2007, 117(4): 850-8.

Fucharoen S, Singsanan S, Hama A, Fucharoen G, Sanchaisuriya K. Rapid molecular characterization of Hb Queens and Hb Siam: two variants easily misidentified as sickle Hb. *Clin Biochem.* 2007; 40: 137-40

González FA, Ropero P, Iglesia S, Polo M, Benavente C, Villegas A. Hemoglobina Stanleyville-II [ $\alpha$ 78(EF7)Asn $\rightarrow$ Lys]. Primer caso descrito em Espanha. *Med Clin (Barc).* 2008; 131 (12):463-5.

Globin Gene Server. Hb Var: a database of human hemoglobin variants and thalassemias. [Citado em 2010 Mar. 10]. Available from: <http://globin.cse.psu.edu/globin/hbvar/>.

Gulbis B, Tshilolo L, Wajcman H, Riou J, Galactéros F, Promé D, Kister J, Papsotiriou I, Van Laethem Y, Vertongen F. Structural and functional studies of hemoglobin Moabit (alpha 86 (F7) Leu  $\rightarrow$ Arg. *Hematol Cell Ther.* 1997; 39(3):137-8.

Harteveld KL, Heister AJ, Giordano PC, Losekoot M, Bernini LF. Rapid Detection of Point Mutations and Polymorphisms of the  $\alpha$ -Globin Genes by DGGE na SSCA. *Hum Mutat.* 1996. 7:114-22.

Higgs DR, Vickers MA, Wilkie AO, Pretorius IM, Jarman AP, Weatherall DJ. A review of the molecular genetics of the human alpha-globin gene cluster. *Blood.* 1989; 73:1081-04.

Hocking DR. The Separation and Identification of Hemoglobin Variants by Isoelectric Focusing Electrophoresis: An Interpretive Guide. Akron, OH, USA: Isolab; 1997.

Huisman THJ. Usefulness of Cation Exchange High Performance Liquid Chromatography as a Testing Procedure. *Pediatrics*, 1989 May; 83(5):849-51

Januário JN. Incidência da doença falciforme em um milhão de nascidos vivos em Minas Gerais (1998-2001) [dissertação]. Belo Horizonte: Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais; 2002. 124p.

Januário JN, Mourão OG. Manual de organização e normas técnicas para triagem neonatal. Belo Horizonte: Coopmed; 1998.

Jorge SEC, Kimura EM, Oliveira DM. Three new  $\alpha$ -globin variants: Hb Itabira [ $\alpha$ 30B11)Glu $\rightarrow$ Val ( $\alpha$ 1)], Hb Bom Jesus da Lapa [ $\alpha$ 30B11)Glu $\rightarrow$ Ala ( $\alpha$ 1)] and Hb Boa Esperança [ $\alpha$ 16(A14) Lys $\rightarrow$ Thr ( $\alpha$ 2)]. *Hemoglobin.* 2007; 31:151-7.

Kimura EM, Oliveira DM, Jorge SEDC, Abreu CF, Albuquerque DM, Costa FF, Sonati MF. Identificação e caracterização de variantes novas e raras da hemoglobina humana. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2008; 30(4):316-9.

## REFERÊNCIAS

---

- Kleman KM, Vichinsky E, Lubin BH. Experience with newborn screening using isoelectric focusing. *Pediatrics*. 1989; 83(5): 852-4.
- Knuth A, Pribilla W, Marti HR, Winterhalter KH. Hemoglobin Moabit: alpha 86 (F7) Leu leads to Arg: a new unstable abnormal hemoglobin. *Acta Haematol*. 1979; 61(3):121-4.
- Liebhaber SA, Cash FE, Ballas SK. human  $\alpha$ -Globin Gene Expression. The Dominant Role of the  $\alpha 2$ -locus in mRNA and protein synthesis. *J Biol Chem*. 1986; 261(32):15327-33.
- Leoneli GG, Imperial RE, Marchi-Salvador DP, Naoum PC, Bonini-Domingos CR. Hemoglobinas anormais e dificuldade diagnóstica. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2000; 22(3):396-403.
- McCurdy PR, Lorkin PA, Casey R, Lehmann H, Uddin DE, Dickson LG. Hemoglobin S-G (S-D) syndrome  $\alpha$ . *Am J Med*. 1974; 57(4): 665-70.
- Melo LMS, Siqueira FAM, Conte ACF, Bonini-Domingos CR. Rastreamento de hemoglobinas variantes e talassemias com associação de métodos de diagnóstico. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2008; 30(1):12-7.
- Moo-Penn WF, Schmidt RM, Jue DL, Bechtel KC, Wright JM. Hemoglobin S Travis: a Sickling Hemoglobin with Two Amino Acid Substitutions [ $\beta 6(A3)$ Glutamic Acid  $\rightarrow$ Valine and  $\beta 142(H20)$  Alanine  $\rightarrow$ Valine]. *Eur J Biochem*. 1977; 77:561-6
- Murao M, Ferraz MHC. Traço falciforme – heterozigose para hemoglobina S. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2007; 29(3):223-5.
- Naoum PC. Hemoglobinopatias e talassemias. São Paulo: Editora Sarvier, 1997. 171p.
- Naoum, P. C. Interferentes eritrocitários e ambientais na anemia falciforme. *Rev. bras. hematol. Hemoter*. 2000; 22(1): 05-22.
- North ML, Darbre PD, Lehmann H, Juif JG. Haemoglobin Stanleyville II (alpha75 [EF7] Asn yields Lys) found in France. *Acta Haematol*. 1975;53(1):56-9.
- North ML, Hassan W, Thillet J, Schwartz M, Taubert C, Ritter J, Gandar R, Rosa J. Clinical and biological studies of an hybrid S/Stanleyville II hemoglobin (alpha 2 78 Asn replaced by Lys beta 2 6 Glu replaced by Val) (author's transl). *Nouv Rev Fr Hematol*. 1980;22(3):235-41.
- Ou CN, Rognerud CL. Diagnosis of hemoglobinopathies: electrophoresis vs. HPLC. *Clin Chim Acta*. 2001 Nov; 313(1-2):187-94.
- Ostendorf N, Glosemeyer-Allhoff T, Schauerte K, Yamamoto R. Hemoglobin (Hb) Stanleyville II causes gross overestimation of the Hb A<sub>1c</sub> proportion in routine HPLC. *Clin Chem*. 2005; 51(9):1752-4.
- Paixão MC, Ferraz MHC, Januário JJ, Viana MB, Lima JM. Reliability Of

## REFERÊNCIAS

---

Isoelectrofocusing For The Detection of Hb S, Hb C, And Hb D In A Pioneering Population-Based Program Of Newborn Screening In Brazil. *Hemoglobin*. 2001; 25:3 297-303.

Perkin Elmer Life Sciences. Hemoglobin Test Kit. Norton, OH-USA: Perkin Elmer; 2003.

Ramalho AS, Magna LA, Paiva e Silva RB. A Portaria nº 822/01 do Ministério da Saúde e as peculiaridades das hemoglobinopatias em saúde pública no Brasil. *Cad Saúde Pública*. 2003; 19:1195-9.

Rhoda MD, Martin J, Blouquit Y, Garel MC, Edelstein SJ, Rosa J. Sickle cell hemoglobin fiber formation strongly inhibited by the Stanleyville II mutation ( $\alpha78$  Asn $\rightarrow$ Lys). *Biochem Biophys Res Commun*. 1983; 111(1):8-13.

Rochette J, Barnetson R, Kiger L, Kister J, Littlewood TJ, Webster R, Poyart C, Thein SL. Association of a novel high oxygen affinity haemoglobin variant with delta beta thalassaemia. *Br J Haematol*. 1994; 86:118-124.

Sanchaisuriya K, Chunpanich S, Fucharoen G, Fucharoen S. Multiplex allele-specific PCR assay for differential diagnosis of Hb S, Hb D-Punjab and Hb Tak. *Clin Chim Acta*. 2004; 343:129-34.

Sangkitporn S, Rerkamnuaychoke B, Sangkitporn S, Mitrakul C, Sutivigit Y. Hb G Makassar (Beta 6 : Glu $\rightarrow$ Ala) in a Thai Family. *J Med Assoc Thai*. 2002; 85: 577-82.

Serjeant GR. Screening for sickle-cell disease in Brazil. *Lancet*. 2000; 356:168-9.

Serjeant GR, Wild B, Tebasulwa S, Mason KP, Serjeant BE, Ndugwa CM. Sickle haemoglobin and haemoglobin Stanleyville II: possible confusion with sickle cell-haemoglobin C disease. *East Afr Med J*. 2005; 82(7):367-370.

Sommer CK, Goldberck AS, Wagner SC, Castro SM. Triagem neonatal para hemoglobinopatias: experiência de um ano na rede de saúde pública do Rio grande do Sul, Brasil. *Cad Saúde Pública*. 2006, 22(8):1709-14.

Sonati Mde F, Costa FF. The genetics of blood disorders: hereditary hemoglobinopathies. *J Pediatr (Rio J)* 2008; 84(4 Suppl):40-51.

Souza LR, Kimura EM, Albuquerque DM, Costa FF, Sonati MF. Hb Osu-Christiansborg [ $\beta52$ (D3)Asp $\rightarrow$ Asn]: A De Novo Mutation in Brazil. *Hemoglobin*. 2004; 28(1): 65-8

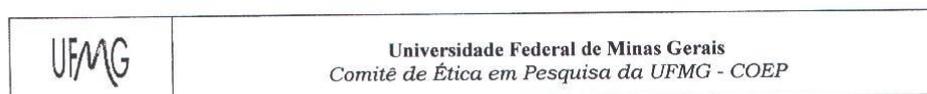
Souza AES, Cardoso GL, Takanashi SYL, Guerreiro JF.  $\alpha$ -Thalassemia (3.7 kb deletion) in a population from the Brazilian amazon region: Santarém, Para State. *Genet Mol Res*. 2009; 8(2):477-81.

Tan AS, Quah TC, Low PS, Chong SS. A Rapid and reliable 7- deletion multiplex polymerase chain reaction assay for alpha-thalassemia. *Blood*. 2001 July; 98(1):250-1.

- Van Ros G, Beale D, Lehmann H. Haemoglobin Stanleyville II ( $\alpha$ 78 Asparagine  $\rightarrow$ Lysine). *Br Med J*. 1968; 4: 92-93, 94-4
- Viprakasit V, Wiriyasateinkul A, Sattayasevana B, Miles KL, Laosombat V. Hb G-Makassar [ $\beta$ 6(A3)Glu $\rightarrow$ Ala; codon 6 (GAG $\rightarrow$ GCG)]: molecular characterization, clinical, and hematological effects. *Hemoglobin*. 2002; 26:245-53.
- Waitumbi JN, Kifude CM, Withers MR, Polhemus ME, Heppner Jr DG, Ogutu BR. Hb G-Philadelphia or Stanleyville II? When the phenotype and genotype do not agree. *Eur J Haematol*. 2007; 79(2):177-8.
- Walsh PS, Metzger DA, Higuchi R. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques*. 1991; 10: 506-13.
- Weatherall DJ. Hemoglobinopathies worldwide: present and future. *Curr Mol Med*. 2008; 8(7):592-9.
- Weatherall DJ, Clegg JB. Inherited haemoglobin disorders: an increasing global health problem. *Bull WHO*. 2001; 79:704-12.
- Wenning MRSC, Kimura EM, Jorge SB, Costa FF, Sonati MF. Molecular characterization of hemoglobins Kurosaki [ $\alpha$ 7 Lys>Glu], G-Pest [ $\alpha$ 74 Asp>Asn], Stanleyville-II [ $\alpha$ 78 Asn>Lys] and J-Rovigo [ $\alpha$ 53 Ala>Asp]. *Acta Haematol*. 1999; 102:203-205.
- Wenning MRSC, Kimura EM, Costa FF, Saad STO, Gervasio S, Jorge SB, Borges E, Silva NM, Sonati MF.  $\alpha$ -Globin genes: thalassemic and structural alterations in a Brazilian population. *Braz J Med Biol Res*. 2000; 33:1041-5.
- Zago MA, Costa FF. Hereditary haemoglobin disorders in Brasil. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1985; 79(3):385-8.
- Zago MA, Costa FF, Tone LG, Bottura C. Hereditary hemoglobin disorders in a Brazilian population. *Hum Hered*. 1983;33(2):125-9.
- Zamaro, PJ, Bonini-Domingos CR. Abnormal hemoglobin phenotypes in carriers of mild anemia in Latin America. *Genet Mol Res*. 2010; 9(1):425-8.
- Zorai A, Harteveld CL, Bakir A, Van Delft P, Falfoul A, Dellagi K, Abbes S, Giordano PC. Molecular spectrum of  $\alpha$ -Thalassemia in Tunisia: epidemiology and detection at birth. *Hemoglobin*. 2002 Nov; 26(4):353-62.

## 9. ANEXOS

### 9.1 Aprovação COEP



#### Parecer nº. ETIC 295/07

**Interessado(a): Prof. Marcos Borato Viana**  
**Departamento de Pediatria**  
**Faculdade de Medicina-UFMG**

#### DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 29 de junho de 2007, após atendidas as solicitações de diligência, o projeto de pesquisa intitulado "**Identificação de hemoglobinas com corrida eletroforética semelhante à hemoglobina S no Programa Estadual de Triagem Neonatal em Minas Gerais**" bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.

  
**Profa. Dra. Maria Elena de Lima Perez Garcia**  
**Coordenadora do COEP-UFMG**

**ANEXO 9.2 – Aprovação Comitê de Ética da Fundação HEMOMINAS**



Belo Horizonte, 08 de outubro de 2007

OFÍCIO Nº 69 / 2007  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA  
FUNDAÇÃO HEMOMINAS

Prezado Senhor Pesquisador, Marcos Borato Viana

Encaminhamos o parecer consubstanciado referente ao seu projeto de pesquisa “Identificação de hemoglobinas com corrida eletroforética semelhante à hemoglobina S no Programa Estadual de Triagem Neonatal de MG, por meio das técnicas de PCR e seqüenciamento gênico”, nº de registro 173. Seu projeto foi aprovado por nosso Comitê, e então, a partir deste momento, sua pesquisa pode ser desenvolvida no âmbito da Fundação Hemominas.

Desejamos boa sorte e sucesso em seu estudo.

Atenciosamente,

  
Marina Lobato Martins

Secretária do Comitê de Ética em Pesquisa  
Fundação Hemominas

**ANEXO 9.3 – Aprovação DEPE-HC/UFMG**



**Universidade Federal de Minas Gerais**  
**Hospital das Clínicas**  
*Diretoria de Ensino, Pesquisa e Extensão - DEPE*

**UFMG**

Belo Horizonte, 09 de outubro de 2007.

PROCESSO Nº 106/2007

**TÍTULO: “Identificação de hemoglobina com corrida eletroforética semelhante à hemoglobina S no Programa Estadual de Triagem Neonatal em Minas Gerais.”**

Sr(a) Pesquisador(a):

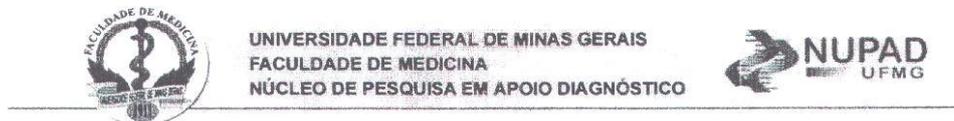
Reportando-nos ao projeto de pesquisa acima referenciado, considerando sua concordância com o parecer da Comissão de Avaliação Econômico-financeira de Projetos de Pesquisa do HC e a aprovação pelo COEP/UFMG em 29/06/2007, esta Diretoria aprova seu desenvolvimento no âmbito institucional. Solicitamos enviar à DEPE relatório parcial ou final, após um ano.

Atenciosamente,

  
PROF. HENRIQUE VITOR LEITE  
Diretor da DEPE/HC-UFMG

Ao Sr.  
Prof. Marcos Borato Viana  
Depto. de Pediatria  
Faculdade de Medicina / UFMG

## ANEXO 9.4 – Apoio Logístico Nupad-UFMG

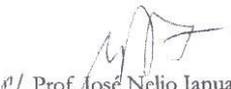


### DECLARAÇÃO DE APOIO INSTITUCIONAL

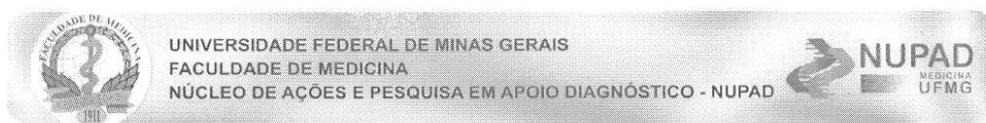
Declaramos que o projeto intitulado **“Identificação de hemoglobinas com corrida eletroforética semelhante à hemoglobina S no Programa Estadual de Triagem Neonatal de Minas Gerais”**, coordenado pela Prof. Marcos Borato Viana, foi considerado exequível no âmbito do Núcleo de Pesquisa em Apoio Diagnóstico da Faculdade de Medicina da UFMG – Nupad.

Conforme normas regimentais, o projeto receberá, através da Central de Projetos do Nupad-FM /UFMG, o apoio logístico solicitado no corpo do mesmo para garantir sua plena viabilização.

Belo Horizonte, 12 de junho de 2007.

  
/ Prof. José Nelio Januario  
Diretor Geral do NUPAD  
Faculdade de Medicina - UFMG

## ANEXO 9.5 – Modelo de Carta Convite para Participação na Pesquisa



Belo Horizonte, 12 de abril de 2008

Aos pais \_\_\_\_\_

Código: \_\_\_\_\_

Senhores Pais,

Ao nascer, seu filho (ou filha) realizou o “Teste do Pezinho” no Programa Estadual de Triagem Neonatal de Minas Gerais - PETN (Nupad - Faculdade de Medicina da UFMG). O resultado da análise de hemoglobinas constatou a presença de hemoglobina AS (Portador de Traço para Doença Falciforme), o que NÃO significa doença.

Gostaríamos de convidar seu filho (ou filha) para participar de um estudo que irá confirmar o resultado do teste do pezinho, por meio de técnicas mais modernas e específicas.

Para a participação no estudo, é necessário levar sua criança ao Centro de Saúde mais próximo de sua residência para a coleta de uma nova amostra de sangue. Ela será colhida em papel-filtro por profissionais treinados, como usualmente é feito no Programa.

Gostaríamos de contar com sua colaboração, o que muito contribuirá com os avanços dos métodos para diagnosticar as doenças das hemoglobinas, garantindo a qualidade na realização dos futuros “Testes do Pezinho”.

O resultado do exame será encaminhado a vocês, posteriormente, com todas as explicações que forem necessárias.

Por favor, levar esta cartinha para que o técnico saiba do motivo da nova coleta.

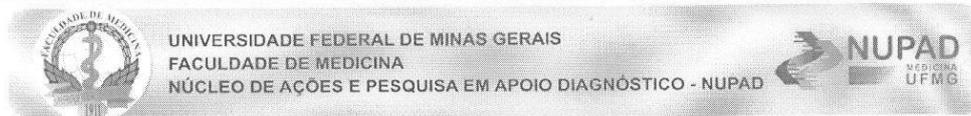
Em caso de dúvida, favor entrar em contato conosco pelos telefones:

**(31) 3244 6400 / 3244 6411 / 3244 6412 - Daniela Dutra ou Ana Neres.**

Atenciosamente,

Dra. Ana Paula Pinheiro Chagas Fernandes  
Supervisão Médica  
Setor de Controle do Tratamento/NUPAD

## ANEXO 9.6 – Modelo de Carta Convite para Participação na Pesquisa



Belo Horizonte, 12 de abril de 2009

Aos pais de: \_\_\_\_\_

Código: \_\_\_\_\_

Senhores Pais,

Ao nascer, seu filho (ou filha) realizou o “Teste do Pezinho” no Programa Estadual de Triagem Neonatal de Minas Gerais (Nupad - Faculdade de Medicina da UFMG). O resultado da análise de hemoglobinas constatou a presença de uma hemoglobina que não é comum. O resultado fornecido naquela época dizia: “hemoglobina RARA” (padrão eletroforético compatível com a presença da hemoglobina A e uma hemoglobina correndo na região de S”).

Embora este resultado NÃO signifique doença falciforme, a dúvida sobre essa hemoglobina ainda continua e, por isso, gostaríamos de convidar seu filho (ou filha) para participar de um estudo que irá tentar identificar essa hemoglobina por meio de técnicas mais modernas e específicas.

Para a participação no estudo, é necessário levar sua criança ao Centro de Saúde mais próximo de sua residência para a coleta de uma nova amostra de sangue. Ela será colhida em papel-filtro por profissionais treinados, como usualmente é feito no Programa.

Gostaríamos de contar com sua colaboração, o que muito contribuirá com os avanços dos métodos para diagnosticar as doenças das hemoglobinas, garantindo a qualidade na realização dos futuros “Testes do Pezinho”.

O resultado do exame será encaminhado a vocês, posteriormente, com todas as explicações que forem necessárias.

Por favor, levar esta cartinha para que o técnico saiba do motivo da nova coleta.

Em caso de dúvida, favor entrar em contato conosco pelos telefones:

**(31) 3409.8909 / 3409.9714 - Daniela Dutra ou Fernanda.**

Atenciosamente,

Dra. Ana Paula Pinheiro Chagas Fernandes  
Supervisão Médica  
Setor de Controle do Tratamento/NUPAD

## **ANEXO 9.7 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (criança)**

### **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO** **(para familiares ou responsável por criança participante do estudo)**

Seu/sua filho (a), ou criança pela qual a Senhora ou Senhor é responsável, está sendo convidada, como voluntário (a), a participar na pesquisa: "Identificação de hemoglobinas com corrida eletroforética semelhante à hemoglobina S no Programa Estadual de Triagem Neonatal de MG, por meio das técnicas de PCR e sequenciamento gênico".

A anemia falciforme é a doença hereditária mais comum no Brasil. Trata-se de uma doença de caráter genético, em que ocorre uma alteração da estrutura da hemoglobina normal resultando em uma hemoglobina diferente - a variante S.

Os glóbulos vermelhos que contêm predominantemente hemoglobina S assumem forma semelhante à de uma foice em algumas condições como, por exemplo, baixas concentrações de oxigênio. Ao assumirem essa forma, os glóbulos vermelhos são mais facilmente destruídos e podem provocar obstrução do fluxo sanguíneo, levando a algumas manifestações clínicas da doença como: icterícia (amarelão), infecções e dores, dentre outros. O tratamento profilático precoce e o acompanhamento das crianças acometidas são as melhores formas de reduzir a intensidade dessas manifestações.

Atualmente existem mais de 600 variantes de hemoglobina detectadas nos testes de triagem neonatal (teste do pezinho) e algumas delas podem apresentar manifestações clínicas semelhantes às da hemoglobina S. É necessário diferenciar a hemoglobina S dessas outras hemoglobinas com a finalidade de excluir a doença falciforme e de verificar sua importância clínica.

Para a participação da criança no estudo, será necessária a coleta de uma a três amostras de sangue venoso (5 ml cada) para realização de testes laboratoriais, tais como focalização isoelétrica (IEF), métodos de biologia molecular, dosagens bioquímicas e hematológicas, dentre outros. Além disso, poderá ser necessária a realização de consultas médicas e exames de imagem (radiografias e ultrassom), caso se suspeite que a criança tenha algum problema médico que justifique esses procedimentos.

O único desconforto existente para a participação no estudo consiste no incômodo da punção venosa para retirada de sangue, procedimento que será realizado por profissionais treinados e qualificados. Raramente, pode ocorrer hematoma (mancha de sangue) no local de penetração da agulha que se usa na coleta de sangue. Caso a criança apresente algum problema em seus exames clínicos e laboratoriais, ela será encaminhada para consulta médica e aconselhamento.

Nenhum tipo de pagamento ou gratificação financeira será feito pela participação na pesquisa. Asseguramos que todos os dados obtidos são sigilosos e serão utilizados somente para esta pesquisa, não sendo armazenados para estudos futuros. Garantimos sua liberdade de retirar o presente consentimento em qualquer momento que desejar fazê-lo.

Eu, \_\_\_\_\_ (pai, mãe ou responsável)  
pelo menor \_\_\_\_\_, declaro que li  
(ou ouvi a leitura) e tive a oportunidade de ter esclarecidas as minhas dúvidas a respeito desta  
pesquisa. Autorizo a participação de meu filho (a) ou criança sob minha responsabilidade  
neste estudo, a coleta de dados no prontuário médico, a coleta de sangue e a realização de  
exames e consultas médicas. Estou também ciente que não sou obrigado (a) a dar essa  
autorização e, se o faço, não me sinto coagido (a) a fazê-lo. Foi-me garantido que posso retirar  
meu consentimento a qualquer momento e a não-autorização para realização dos  
procedimentos não trará nenhum prejuízo para a criança, para mim ou minha família.

---

ANEXOS

---

**Assinatura do responsável**

**Local:** \_\_\_\_\_ **Data:** \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG - COEP / UFMG

**Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 - Unidade Administrativa 2 - 2º andar - CEP: 31.270-901 - BH / MG**

**Tel (31) 3499-4592 - [coep@prpq.ufmg.br](mailto:coep@prpq.ufmg.br)**

**Pesquisadora: Fernanda Silva Pimentel - Tel (31) 8808-9812 / (31) 3409-9714**

**Coordenador da Pesquisa: Dr. Marcos Borato Viana - Tel (31) 3409-9772 / (31) 9202-3938**

**ANEXO 9.8 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (pais)**

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**  
**(para os familiares adultos participantes do estudo)**

Você está sendo convidado (a), como voluntário (a), a participar da pesquisa: “Identificação de hemoglobinas com corrida eletroforética semelhante à hemoglobina S no Programa Estadual de Triagem Neonatal de MG, por meio das técnicas de PCR e sequenciamento gênico”.

A anemia falciforme é a doença hereditária mais comum no Brasil. Trata-se de uma doença de caráter genético, em que ocorre uma alteração da estrutura da hemoglobina normal resultando em uma hemoglobina diferente - a variante S.

Os glóbulos vermelhos que contêm predominantemente hemoglobina S assumem forma semelhante à de uma foice em algumas condições como, por exemplo, baixas concentrações de oxigênio. Ao assumirem essa forma, os glóbulos vermelhos são mais facilmente destruídos e podem provocar obstrução do fluxo sanguíneo, levando a algumas manifestações clínicas da doença como: icterícia (amarelão), infecções e dores, dentre outros. O tratamento profilático precoce e o acompanhamento das crianças acometidas são as melhores formas de reduzir a intensidade dessas manifestações.

Atualmente existem mais de 600 variantes de hemoglobina detectadas nos testes de triagem neonatal (teste do pezinho) e algumas delas podem apresentar manifestações clínicas semelhantes às da hemoglobina S. É necessário diferenciar a hemoglobina S dessas outras hemoglobinas com a finalidade de excluir a doença falciforme e de verificar sua importância clínica.

Para sua participação no estudo, caso seja necessário um estudo familiar mais amplo para esclarecer a natureza da alteração da hemoglobina encontrada em seu filho (a), será necessária a coleta de uma a três amostras de sangue venoso (5 ml cada) para realização de testes laboratoriais, tais como focalização isoeletrica (IEF), métodos de biologia molecular, dosagens bioquímicas e hematológicas, dentre outros. Além disso, poderá ser necessária a realização de consultas médicas e exames de imagem (radiografias e ultra-som).

O único desconforto existente para a participação no estudo consiste no incômodo da punção venosa para retirada de sangue, procedimento que será realizado por profissionais treinados e qualificados. Raramente, pode ocorrer hematoma (mancha de sangue) no local de penetração da agulha que se usa na coleta de sangue. Caso você apresente algum problema em seus exames clínicos e laboratoriais, você será encaminhado(a) para consulta médica e aconselhamento.

Nenhum tipo de pagamento ou gratificação financeira será feito pela sua participação. Asseguramos que todos os dados obtidos são sigilosos e serão utilizados somente para esta pesquisa, não sendo armazenados para estudos futuros. Garantimos sua liberdade de retirar o presente consentimento em qualquer momento que desejar fazê-lo.

**Eu, \_\_\_\_\_ (pai, mãe ou parente) do (a) menor \_\_\_\_\_, declaro que li (ou ouvi a leitura) e tive a oportunidade de ter esclarecidas as minhas dúvidas a respeito desta pesquisa. Desejo participar do estudo e autorizo a coleta de dados no prontuário médico, a coleta de sangue e a realização de exames e consultas médicas. Estou também ciente que não sou obrigado (a) a dar essa autorização e, se o faço, não me sinto coagido (a) a fazê-lo. Foi-me garantido que**

**posso retirar meu consentimento a qualquer momento e a não-autorização para realização dos procedimentos não trará nenhum prejuízo para mim ou minha família.**

---

**Assinatura**

**Local:** \_\_\_\_\_ **Data:** \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG - COEP / UFMG

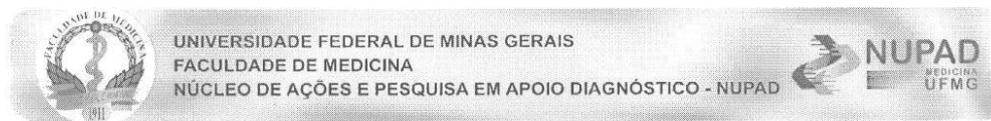
**Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 - Unidade Administrativa 2 - 2º andar - CEP: 31.270-901 - BH / MG**

**Tel (31) 3499-4592 - [coep@prpq.ufmg.br](mailto:coep@prpq.ufmg.br)**

**Pesquisadora: Fernanda Silva Pimentel - Tel (31) 8808-9812 / (31) 3248-9714**

**Coordenador da Pesquisa: Dr. Marcos Borato Viana - Tel (31) 3248-9772 / (31) 9202-3938**

## ANEXO 9.9 – Modelo do Comunicado aos Responsáveis pela Triagem Neonatal



Belo Horizonte, 30 de janeiro de 2008.

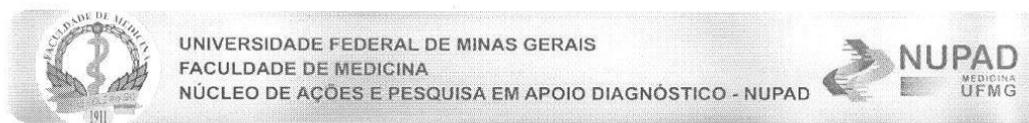
Aos técnicos responsáveis pela triagem neonatal nos centros de saúde

Senhor (a) Técnico (a),

A partir deste mês iniciaremos o estudo "Identificação de hemoglobinas com corrida eletroforética semelhante à hemoglobina S no Programa Estadual de Triagem Neonatal de Minas Gerais". Com ele pretende-se fazer a diferenciação diagnóstica entre a Hb S e outras variantes desconhecidas com perfil eletroforético semelhante ao da Hb S.

Para isso, convidaremos aproximadamente 220 crianças triadas pelo PETN no período de 1998 a 2006, residentes em várias regiões de Minas Gerais, e cujos resultados da análise de hemoglobinas foram **indeterminados ("ind")** ao nascimento. Os resultados foram reanalisados em amostra colhida em torno do 6.º mês de vida da criança. Constatou-se, então, a presença de **provável hemoglobina AS** ("Portador de Traço para Doença Falciforme") ou de hemoglobina **RARA** ("Padrão eletroforético compatível com a presença da hemoglobina A e outra hemoglobina não identificada, correndo na região da hemoglobina S"). O objetivo do estudo é, inicialmente, confirmar ou não o estado de portador do traço para doença falciforme. Posteriormente, por meio de métodos modernos de estudo do DNA, tentaremos identificar o tipo exato de hemoglobina que a criança apresenta. Isso pode trazer benefícios importantes no atendimento e no aconselhamento genético das famílias.

Informamos que o estudo já foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG - COEP/UFMG. Para participação no estudo, enviaremos uma carta convite para os pais das crianças selecionadas (modelo em anexo) solicitando que os mesmos procurem o Centro de Saúde para colher uma nova amostra do Teste do Pezinho, levando junto a carta convite. Ao procurar o Centro de Saúde, os pais deverão ser orientados a ler e assinar um Termo de Consentimento para participação no estudo (modelo em anexo), pois sem este Termo torna-se legalmente inviável sua participação. O Termo a ser assinado é muito simples, pois o projeto não envolve risco para as crianças e suas famílias. Sendo assim, gostaríamos de contar com a colaboração de V.Sas. no auxílio da leitura e entendimento do Termo por parte dos pais. Caso seja necessário, sinta-se à vontade para fazer contato conosco para outros esclarecimentos.



Serão encaminhadas para o Centro de Saúde:

- 1) Relação contendo os códigos e nomes das crianças convidadas para o estudo;
- 2) Cartas individuais com convite de participação aos pais. Solicitamos que essas cartas sejam enviadas aos mesmos;
- 3) Termos de Consentimento que devem permanecer no Centro de Saúde para serem assinados pelos pais ou responsáveis na própria unidade, antes da coleta da nova amostra, após leitura e concordância para participarem do estudo.

A coleta deverá ser feita utilizando-se o mesmo código da triagem neonatal, mencionado na carta convite. A amostra e o envelope deverão ser preenchidos com caneta vermelha e identificados com a frase: Estudo da hemoglobina S, bem legível.

Os resultados serão encaminhados aos pais, via Centro de Saúde, após análise pelo Programa do Teste do Pezinho (NUPAD).

Gostaríamos de contar com sua colaboração, o que muito contribuirá com os avanços dos métodos para diagnosticar as doenças das hemoglobinas, garantindo a qualidade na realização dos futuros "Testes do Pezinho".

Em caso de dúvida, favor entrar em contato conosco pelos telefones:

**(31) 3244 6400 / 3244 6411 / 3244 6412 - Daniela Dutra ou Ana Neres.**

Atenciosamente,

Dra. Ana Paula Pinheiro Chagas Fernandes  
Supervisão Médica  
Setor de Controle do Tratamento - NUPAD / FM / UFMG

## **ANEXO 9.10 – Protocolos das metodologias realizadas no Laboratório de Genética e Biologia Molecular do Nupad**

### **1. Extração do DNA a partir de sangue papel filtro (método com a resina**

#### ***Chelex 5%***)

(Walsh PS, Metzger DA, Higuchi R. *Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. Biotechniques* 1991; 10:506-513)

- Em um eppendorf de 1,5 ml coloca-se 1 ml de água bidestilada;
- Picotar um círculo de aproximadamente 5 mm colocando-o no tubo com a água;
- Colocar em agitação lenta por 40 minutos;
- Centrifugar a 14.000 rpm por 6 minutos, a temperatura ambiente;
- Retirar o sobrenadante deixando aproximadamente 20 µL do mesmo;
- Adicionar 150 µL de *Chelex* a 5%;
- Aplicar vortex por 10 segundos;
- Colocar em banho maria a 56°C por 20 minutos;
- Aplicar vortex por 10 segundos;
- Colocar em banho seco a 100°C por 8 minutos;
- Aplicar vortex por 10 segundos;
- Armazenar entre 2 – 8C ° ou a - 20°C.

### **2. Extração do DNA a partir de sangue periférico (Método com a resina**

#### ***Chelex 5%***)

Para realização desta extração utiliza-se o mesmo protocolo descrito para a extração do DNA a partir do papel filtro, com as seguintes modificações:

- Substitui-se o papel filtro por 100 µL de sangue periférico
- Substitui-se 150 µl de *Chelex* a 5% por 200 µL

### 3 . PCR alelo específica para detecção da mutação que origina a HbS

*Primers S1 e G37 a 10 pmol/μL (Sanchaisuriya et al, 2004)*

<i>Mix</i>		<i>Hot EnzimaGoTaq</i>		<b>DNA</b>
<i>Primer</i>	1,0 μL de cada			<b>10,0 μL</b>
<i>Buffer</i>	10,0 μL	Enzima	0,25 μL	
DNTP's	1,0 μL	<i>Buffer</i>	0,3 μL	
Água	24,0 μL	Água	2,45 μL	
<b>Total Mix</b>	<b>37,0 μL</b>	<b>Total</b>	<b>3,0</b>	

**Programa: HbS-58**

- 1- 94°C – 3 min
- 2- 94°C – 30 seg
- 3- 58°C – 30 seg
- 4- 72°C – 1 min
- 5- Voltar ao 2 30X
- 6- 72°C – 10 min
- 7- 4°C – ∞

#### 4 - Eletroforese

##### Preparo do gel acrilamida a 6% com uréia

Montar os vidros

- Adicionar em uma proveta 42 ml de acrilamida 6% com ureia
- Adicionar 270 μL de PSA
- Adicionar 2 μL temed

##### Corrida eletroforética:

- Colocar o gel na pré-corrida por 30 minutos a 200 V
- Aplicar 10 μL de cada produto
- Correr a 400 V por aproximadamente 2 horas

##### Procedimento de coloração do gel

- Rotular a cuba
- Colocar o gel na cuba com o fixador (ácido acético) por 20’;
- Reservar o ácido para interromper a revelação;
- Lavar com água destilada 2 vezes por 3’
- Agitar na prata por 30’
- Retirar da prata e lavar por 10 segundos com água destilada
- Colocar o revelador (gelado)
- Após a revelação completa, interromper com ácido acético já reservado.
- Fotografar o gel

## 5. Sequenciamento dos éxons 1, 2 e 3 da cadeia beta

5.1 Extração do DNA em sangue periférico metodologia de *Chelex 5%*

5.2 PCR para: éxon 1 - *primer 1A + 1B* (177 pb)

éxon 2 - *primer 2A + 2B* (276 pb)

éxon 3 – *primer 3A + 3B* (229 pb)

*Primers* a 10 pmol/μL cada (Chinchang *et al*, 2005)

<b>Mix</b>		<b>Hot EnzimaGoTaq</b>		<b>DNA</b>
<i>Primer</i>	1,0 μL de cada	Enzima	0,25 μL	
<i>Buffer</i>	10,0 μL	<i>Buffer</i>	0,3 μL	
DNTP's	1,0 μL	Água	2,45 μL	
Água	32,0 μL			
<b>Total Mix</b>	<b>45,0 μL</b>	<b>Total</b>	<b>3,0</b>	

<b>Programa: Exon 1</b>	<b>Programa: Exon 2</b>	<b>Programa: Exon 3</b>
1- 95°C – 2 min	1- 95°C – 2 min	1- 95°C – 2 min
2- 94°C – 30 seg	2- 94°C – 30 seg	2- 94°C – 30 seg
3- 55°C – 30 seg	3- 53°C – 30 seg	3- 57°C – 30 seg
4- 72°C – 30 seg	4- 72°C – 30 seg	4- 72°C – 30 seg
5- Voltar ao 2 35X	5- Voltar ao 2 35X	5- Voltar ao 2 35X
6- 72°C – 5 min	6- 2°C – 5 min	6- 72°C – 5 min
7- 4°C – ∞	7- 74°C – ∞	7- 4°C – ∞

### 5.3.1 Protocolo de purificação de PCR por precipitação alcoólica

(Adaptado de *APPLIED BIOSYSTEMS*. Automated DNA sequencing – Chemistry guid, cap.3, p. 34-35, 1998).

- Preparar Isopropanol 70% e Etanol a 70% em água tipo 1 e mantê-los a temperatura ambiente. Utilizar vidrarias autoclavadas;
- O produto de PCR deve estar em tubo tipo eppendorf de 0,5 ml (para que não seja necessária a transferência de tubo);
- Adicionar isopropanol 70 % ao produto de PCR (proporção 4:1);
- Homogeneizar em vortex o suficiente para misturar;
- Incubar a temperatura ambiente por 15 minutos;
- Centrifugar 30 minutos a 14.000 rpm;
- Descartar o sobrenadante cuidadosamente para não perder o *pellet* (aspire o sobrenadante com uma ponteira);
- Dar um pulso e retirar o resto do sobrenadante;
- Adicionar 100 µL de etanol a 70%;
- Homogeneizar em vortex por 1 minuto (se for utilizado o multivortex é por 5 minutos);
- Centrifugar por 15 minutos a 14.000 rpm;
- Descartar o sobrenadante cuidadosamente para não perder o *pellet* (aspire o sobrenadante com uma ponteira);
- Repetir os passos 9, 10, 11 e 12;
- Dar um pulso e retirar o resto do sobrenadante;
- Suspender o *pellet* em 50 µL de água destilada;
- Homogeneizar em vortex por 2 minutos (se for utilizado o multivortex é por 10 min);
- Fazer a quantificação em gel de agarose 2 % utilizando o *mass ladder*, seguir com a reação de sequenciamento.

NOTA: Ao centrifugar as amostras colocar os tubos com a “alça” para fora da centrífuga de modo que o *pellet* fique sempre na mesma posição, pois nem sempre é possível visualizá-lo.

#### **5.4. Sequenciamento dos genes alfa1 e alfa2**

5.4.1 Extração do DNA em sangue periférico metodologia de Chelex 5% (idem gene beta)

5.4.2 PCR para os genes Alfa1 e Alfa2

- *Primers S7, S6, S3, S1, S18* (Zorai *et al*, 2002 e Hartevelde *et al*, 1996) a 25 pmol/ul cada

- *Primer 3.7/20.5R* cedido pela Fundação Hemominas, a 25 pmol/μL

**Alfa 1:** PCR com S7 e 3.7-20.5R

*Nested-PCR* com S1/S18 e S3/3.7-20.5R

**Alfa 2:** PCR com S7/S6

*Nested-PCR* com S1/S18 e S3/S6

### MIX PCR

	<i>Mix</i>	<i>Hot Enzima GoTaq</i>		<b>DNA</b>
<i>Primer</i>	1,0 μL de cada			<b>10 μL</b>
<i>Buffer</i>	10,0 μL	Enzima	0,5 μL	
DNTP's	1,0 μL	<i>Buffer</i>	0,3 μL	
Água	24,0 μL	Água	2,2 μL	
<b>Total Mix</b>	<b>37,0 μL</b>		<b>3,0</b>	

**Programa: Alfa-glob  
(Usado para PCR e  
NESTED)**

- 1- 96°C – 5 min
- 2- 96°C – 45 seg
- 3- 60°C – 1 min
- 4- 72°C – 2 min
- 5- Voltar ao 2 35X
- 6- 96°C – 45 seg
- 7- 60°C – 1 min
- 8- 72°C – 5 min
- 9- Voltar ao 6 5X
- 10- 4°C – ∞

### MIX NESTED-PCR

	<i>Mix</i>	<i>Hot Enzima GoTaq</i>		<b>Produto PCR</b>
<i>Primer</i>	1,0 μL de cada			<b>2,0 μL</b>
<i>Buffer</i>	10,0 μL	Enzima	0,25 μL	
DNTP's	1,0 μL	<i>Buffer</i>	0,3 μL	
Água	33,0 μL	Água	2,45 μL	
<b>Total Mix</b>	<b>46,0 μL</b>		<b>3,0</b>	

### 5.5 Purificação do produto da PCR e quantificação do DNA em Gel agarose

Seguir o protocolo de purificação de PCR por precipitação alcoólica; posteriormente, seguir para a quantificação em gel agarose (idem gene beta)

### 5.6 Reação de Sequenciamento

- Sequenciar com os *primers* S1, S3 e S18 a 5 pmol/ $\mu$ L cada. Seguir o protocolo para reação de sequenciamento (idem gene beta)

**Programa: SEQ50 para S1 e S18**

- 1- 96°C – 10 seg
- 2- 50°C – 5 seg
- 3- 60°C – 4 min
- 4- Voltar ao 1 25X
- 5- 4°C –  $\infty$

**Programa: SEQ60 para S3**

- 1- 96°C – 10 seg
- 2- 60°C – 5 seg
- 3- 60°C – 4 min
- 4- Voltar ao 1 25X
- 5- 4°C –  $\infty$

### 5.7 Precipitação após a reação de sequenciamento

Seguir o protocolo de purificação pós-reação de sequenciamento (idem gene beta).

### 5.8 Análise das sequências

As sequências obtidas foram analisadas por meio do software *sequencing analysis* (versão 3.7). Por meio do programa de alinhamento *Bioedit* (versão 7.0) (Hall, 1999), a sequência de interesse foi alinhada com sequências de referência disponíveis e comparadas por consulta ao *GeneBank*, banco de dados *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>, possibilitando a identificação da variante. Todos os dados foram gravados eletronicamente.

#### SEQUÊNCIA DOS PRIMERS UTILIZADOS (5'- 3')

HbS-F	<a href="#">PG-42A</a>	TGT CAT CAC TTA GAC CTC AC
HbS-R	<a href="#">PG-42B</a>	AGT AAC GGC AGA CTT CTC CA
β-Globina EXON 1	<a href="#">PG-43A</a>	CAT TTG CTT CTG ACA CAA CTG
β-Globina EXON 2	<a href="#">PG-43B</a>	GGT CTC CTT AAA CCT GTC TTG
	<a href="#">PG-44A</a>	TGC CTA TTG GTC TAT TTT CC
	<a href="#">PG-44B</a>	AAC ATC AAG GGT CCC ATA G
β-Globina EXON 3	<a href="#">PG-45A</a>	CAT GTT CAT ACC TCT TAT CTT CCT C
	<a href="#">PG-45B</a>	CCC CAG TTT AGT AGT TGG ACT TAG
ALFA-GLOBINA		
S7	<a href="#">PG-50A</a>	TGG AGG GTG GAG ACG TCC TG
S6	<a href="#">PG-50B</a>	TCC ATT GTT GGC ACA TTC CG
S8	<a href="#">PG-50C</a>	TGT CCA CGC CCA TGC TGG CAC
S1	<a href="#">PG-50D</a>	CAC AGA CTC AGA GAG AAC C
S18	<a href="#">PG-50E</a>	CGT TGG GCA TGT CGT CCA C
S3	<a href="#">PG-50F</a>	CAC GGC AAG AAG GTG GCC GAC
FH	<a href="#">doado pela Hemominas</a>	AAA GCA CTC TAG GGT CCA GCG

Fonte: Laboratório de Genética e Biologia Molecular; Nupad/FM-UFMG

---

**ANEXO 9.11 – Padronização da PCR *multiplex* para o diagnóstico molecular de alfa-talassemia, realizada na Fundação HEMOMINAS**

A reação da PCR *multiplex* foi padronizada para permitir a detecção das sete deleções em uma reação de tubo único. A padronização ocorreu inicialmente com o gene LIS, gene  $\alpha 2$  e a deleção  $-\alpha^{3.7}$ , seguido da padronização com todos os iniciadores. A especificidade da técnica de PCR *multiplex* para o diagnóstico das deleções mais comuns causadoras de  $\alpha$ -Tal foi confirmada utilizando-se controles positivos para as sete deleções testadas, cedidos gentilmente pelo Dr. Samuel S. Chong (Universidade de Cingapura).

As reações de PCR foram realizadas utilizando o kit comercial para PCR *multiplex* (QIAGEN® *Multiplex* PCR kit, QIAGEN). Os primeiros ensaios para padronizar a técnica foram realizados com 100  $\mu\text{M}$  de cada dNTP, 0,75  $\mu\text{M}$   $\text{MgCl}_2$  e 1,25 U *HotStarTaq* DNA polimerase (*Qiagen master mix*), *pool* de iniciadores em concentrações distintas (Tabela 1), e 200 ng de DNA genômico, num volume final de 25  $\mu\text{L}$ .

Nos ensaios seguintes e que levaram à padronização do teste molecular de diagnóstico de  $\alpha$ -Tal as condições para a amplificação da reação da PCR *Multiplex* foram: volume final de 25  $\mu\text{L}$  contendo 100  $\mu\text{M}$  de cada dNTP, 0,75  $\mu\text{M}$   $\text{MgCl}_2$  e 1,25 U *HotStarTaq* DNA polimerase (*Qiagen master mix*), *pool* de iniciadores em concentrações distintas, 1X solução Q e 200 ng de DNA genômico.

Com relação aos ciclos da PCR, estabeleceu-se nos primeiros ensaios: ativação da enzima *hot start* e desnaturação do DNA a 96°C por 15 minutos, seguido de 30 ciclos de 98°C por 45 segundos para desnaturação do DNA, 60°C por 90 segundos para anelamento dos iniciadores, 72°C por 135 segundos para ação da DNA polimerase, seguido por uma extensão final de 5 minutos a 72°C. Posteriormente, a temperatura de anelamento dos iniciadores foi elevada para 62°C visando a melhoria das amplificações.

Para resolução dos produtos da PCR, 10  $\mu\text{L}$  do produto da PCR, adicionado de 1  $\mu\text{L}$  do tampão de corrida xileno cianol 5X foram aplicados em gel de agarose 1% contendo brometo de etídio (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). A corrida de eletroforese foi condicionada a 90 volts durante 2 horas em cuba (HU13, Max Fill) contendo tampão TAE 1X. O gel foi visualizado no transiluminador de luz ultravioleta (*Imagemaster VDS*, *Amersham Pharmacia Biotech*) para análise dos fragmentos amplificados. De acordo com o

tamanho dos fragmentos amplificados, quando comparados com o padrão de peso molecular 500 pb (500 bp DNA *Ladder*, *Invitrogen*) a determinação do genótipo do paciente foi realizada.

**Fonte:**

Belisário AR. Genótipos da alfa-talassemia e haplótipos do agrupamento dos genes da beta-globina como moduladores da gravidade na anemia falciforme em crianças do Programa Estadual de Triagem Neonatal de Minas Gerais matriculados no Hemocentro de Belo Horizonte da Fundação Hemominas. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-graduação em Saúde da Criança e do Adolescente, UFMG, março de 2010.

## ANEXO 9.12 - Cópia da Ata da Defesa de Dissertação



FACULDADE DE MEDICINA  
CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO

Av. Prof. Alfredo Balena 190 / sala 533  
Belo Horizonte - MG - CEP 30.130-100  
Fone: (031) 3409.9641 FAX: (31) 3409.9640  
cpg@medicina.ufmg.br



ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO de **FERNANDA SILVA PIMENTEL**, nº de registro 2008652437. Às quatorze horas, do dia trinta e um de maio de dois mil e dez, reuniu-se na Faculdade de Medicina da UFMG, a Comissão Examinadora de dissertação indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado: **“IDENTIFICAÇÃO DE HEMOGLOBINAS COM CORRIDA ELETROFORÉTICA SEMELHANTE À DA HEMOGLOBINA S NO PROGRAMA ESTADUAL DE TRIAGEM NEONATAL DE MINAS GERAIS (PETN-MG)”**, requisito final para a obtenção do Grau de Mestre em Ciências da Saúde: Saúde da Criança e do Adolescente, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde – Área de Concentração em Saúde da Criança e do Adolescente. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Marcos Borato Vianna, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do trabalho final, passou a palavra à candidata para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu sem a presença da candidata e do público para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof. Marcos Borato Vianna	Instituição: UFMG	Indicação: <u>APROVADA</u>
Profª Cláudia Regina Bonini Domingos	Instituição: UNESP	Indicação: <u>APROVADA</u>
Profª. Maria Christina Lopes Araújo Oliveira	Instituição: UFMG	Indicação: <u>APROVADA</u>

Pelas indicações a candidata foi considerada APROVADA

O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a sessão e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 28 de maio de 2010.

Prof. Marcos Borato Vianna / Orientador [Assinatura]

Profª Cláudia Regina Bonini Domingos [Assinatura]

Profª. Maria Christina Lopes Araújo Oliveira [Assinatura]

Prof. Joel Alves Lamounier/Coordenador [Assinatura]

Obs.: Este documento não terá validade sem a assinatura e carimbo do Coordenador.

Prof. Joel Alves Lamounier  
Coordenador do Programa de  
Pós-Graduação em Ciências da Saúde:  
Saúde da Criança e do Adolescente  
Faculdade de Medicina - UFMG

CONFERE COM ORIGINAL  
Centro de Pós-Graduação  
Faculdade de Medicina - UFMG

**ANEXO 9.13 - Cópia da Declaração de Aprovação da Defesa de Dissertação**



**FACULDADE DE MEDICINA  
CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO**

Av. Prof. Alfredo Balena 190 / sala 533  
Belo Horizonte - MG - CEP 30.130-100  
Fone: (031) 3409.9641 FAX: (31) 3409.9640  
epg@medicina.ufmg.br



**DECLARAÇÃO**

A Comissão Examinadora abaixo assinada, composta pelos Professores Doutores: Marcos Borato Vianna, Cláudia Regina Bonini Domingos e Maria Christina Lopes Araújo Oliveira, aprovou a defesa da dissertação intitulada: **“IDENTIFICAÇÃO DE HEMOGLOBINAS COM CORRIDA ELETROFORÉTICA SEMELHANTE À DA HEMOGLOBINA S NO PROGRAMA ESTADUAL DE TRIAGEM NEONATAL DE MINAS GERAIS (PETN-MG)”**, apresentada pela mestrand **FERNANDA SILVA PIMENTEL**, para obtenção do título de Mestre, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde – Área de Concentração em Saúde da Criança e do Adolescente da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, realizada em 31 de maio de 2010.

Prof. Marcos Borato Vianna  
Orientador

Profª Cláudia Regina Bonini Domingos

Profª. Maria Christina Lopes Araújo Oliveira