

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS E TOXOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MEDICINA CLÍNICA
CENTRO DE HEMATOLOGIA E HEMOTERAPIA DO CEARÁ -HEMOCE

DIFERENCIAÇÃO ELETROFORÉTICA EM pH ÁCIDO
DAS HEMOGLOBINAS S E D

Herene Barros Miranda Lucena

FORTALEZA-CEARÁ

2000

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS E TOXOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MEDICINA CLÍNICA
CENTRO DE HEMATOLOGIA E HEMOTERAPIA DO CEARÁ -HEMOCE

DIFERENCIAÇÃO ELETROFORÉTICA EM pH ÁCIDO DAS HEMOGLOBINAS S E D

Herene Barros Miranda Lucena

Monografia apresentada ao Curso de
Especialização em Hematologia e
Hemoterapia da Universidade Federal
do Ceará, como requisito para obtenção
do título de Especialista.

FORTALEZA

2000

DIFERENCIAÇÃO ELETROFORÉTICA EM pH ÁCIDO DAS HEMOGLOBINAS S E D

Herene Barros Miranda Lucena

**Monografia apresentada como requisito final do Curso de Especialização em
Hematologia e Hemoterapia**

Data: 30 /03/2000

Orientadores:

Dr. Gentil Claudino de Galiza Neto

Dra. Francisca Vânia Barreto de A. F. Gomes

AGRADECIMENTOS

À Deus, que está acima de todas as coisas.

À Dr. Gentil Claudino de Galiza Neto, pela orientação e dedicação na execução deste trabalho.

À Dra Rita Marinei de Vasconcelos Coelho e Dra Fátima Marques de Lima, pela valiosa orientação na parte prática e ajuda nas horas de incertezas e dúvidas.

À Dra Francisca Vânia Barreto A. F. Gomes, pela orientação.

À Kiara , Kátia Valéria e todos os funcionários do setor de Hemoglobina e Hematologia, pela colaboração na prática deste trabalho.

Aos funcionários do Hemoce , pela colaboração no decorrer do curso.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

**AOS MEUS PAIS, GETÚLIO BARROS E
HERBÊNIA MIRANDA LUCENA BARROS,
PELO AMOR, CARINHO E COMPREENÇÃO A
MIM DEDICADOS .**

SUMÁRIO

RESUMO	7
INTRODUÇÃO	8
MATERIAL E MÉTODO	14
RESULTADOS	20
DISCUSSÃO	26
CONCLUSÃO	28
SUMMARY	29
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	30

RESUMO

Este estudo foi realizado com o objetivo de realizar uma nova avaliação eletroforética agora em pH 6,2 de 32 pacientes portadores de anemia falciforme atendidos no Centro de Hematologia e Hemoterapia do Ceará (HEMOCE) e no Hospital Infantil Albert Sabim (HIAS) para confirmação do diagnóstico inicial ou descobrir a presença concomitante da hemoglobina S com a hemoglobina D.

A metodologia utilizada constou das seguintes técnicas: eletroforese em pH alcalino (pH 8.6) e eletroforese em pH ácido (pH 6.2). A eletroforese em pH ácido foi usada para diferenciar a Hb S da Hb D, pois as duas correm na mesma posição na eletroforese em pH alcalino.

Os resultados encontrados foram de um perfil eletroforético homogêneo de hemoglobinopatia SS confirmadas em pH ácido.

INTRODUÇÃO

A hemoglobina é uma proteína de estrutura globular e quaternária composta por quatro cadeias polipeptídicas, ou cadeias de globina, e um grupo prostético (o grupo heme), ligado a cada uma das cadeias de globina.(21)

As cadeias de globina têm sido agrupadas conforme suas similaridades genéticas e estruturais devido às sínteses multigênicas específicas para cadeias de globina dos tipos alfa e beta. A multigenicidade das cadeias de globina do tipo alfa se deve a presença de dois genes específicos para produzir globina alfa e um outro gene também específico para gerar globina zeta, todos no cromossomo 16. As cadeias de globina do tipo beta são sintetizadas por genes unitários e exclusivos para globina beta, delta, gama e épsilon, todos localizados no cromossomo 11.(21)

A molécula de hemoglobina é, portanto, um tetrâmero de cadeias de globina formado por duas cadeias de globina do tipo alfa e duas do tipo beta. Assim, por exemplo, duas globinas alfa (α_2) e duas beta (β_2) compõem a Hb A (normal) e dessa forma, as combinações entre as diferentes globinas determinam os seis tipos de hemoglobinas normais humanas produzidas nas fases do desenvolvimento caracterizadas como embrionária, fetal e pós-nascimento.(21)

A síntese dos diferentes tipos de hemoglobinas embrionárias, fetal e adultas obedecem a um rígido controle genético, envolvendo os genes tipo alfa do cromossomo 16 e os tipo beta do cromossomo 11. As expressões desses genes podem ser avaliadas relacionando-as com o período do desenvolvimento embrionário e fetal. Dessa forma, os diferentes tipos de hemoglobinas embrionárias são sintetizadas gradativamente, até atingirem suas concentrações máximas específicas. A partir desse estágio de produção inicia-se a diminuição de suas sínteses, dando lugar a elaboração de Hb Fetal e , a seguir, das hemoglobinas A e A₂ .

O primeiro tetrâmero hemoglobínico, predominante nas quatro semanas iniciais do período embrionário, é composto por pares de dímeros de cadeias zeta e épsilon ($\zeta_2 \epsilon_2$), que formam a Hb Gower-1. Outras duas hemoglobinas embrionárias , presentes até a 12ª semana, são compostas por pares de cadeias zeta e gama ($\zeta_2 \lambda_2$) e alfa e épsilon ($\alpha_2 \epsilon_2$), que constituem as hemoglobinas Portland e Gower-2, respectivamente. Ao término desse período não ocorre mais síntese das hemoglobinas embrionárias, predominando nesta fase a

hemoglobina Fetal ($\alpha_2 \lambda_2$), cuja produção tem início na Quarta semana de gestação com aumento do seu nível quantitativo progressivo ao desenvolvimento fetal. A Hb A, composta por dímeros de cadeias alfa e beta ($\alpha_2 \beta_2$), é sintetizada a partir da 10ª semana e se mantém em concentrações próximas a 10% até o nascimento. A Hb A₂ por sua vez, formada formada por cadeias alfa e delta ($\alpha_2 \delta_2$), começa a ser sintetizada na 25ª semana em concentrações reduzidas que permanecem até o nascimento, aumentando lentamente até se estabilizarem no sexto mês de vida.(21)

A hemoglobina A é o tipo predominante entre as hemoglobinas normais.(21)

As hemoglobinas anormais constituem a base para a classificação das hemoglobinopatias, grupo de anormalidades hereditárias em que a produção da hemoglobina normal é suprimida e substituída, parcial ou totalmente, pela formação de uma ou mais das muitas variantes hemoglobínicas. (13)

As enfermidades drepanocíticas compreendem um conjunto heterogêneo de afecções com a anemia falciforme ou drepanocítica (homozigose SS), dupla heterozigose por hemoglobina S (Hb S) e outra variante estrutural (SC, SD, SO) e as associações com a α e β talassemia.(7,12,17,23)

A doença falciforme é uma hemoglobinopatia onde se encontra como característica a presença de uma variante mutante da hemoglobina, chamada hemoglobina (Hb S) (sickle-cell ou “célula em foice”)(30)

A hemoglobina S é causada por uma mutação do gene que codifica a cadeia beta da globina, produzindo uma alteração estrutural na molécula. Por ser uma anomalia da globina beta, as características clínicas do estado homozigoto só serão percebidas após a estabilização da produção das globinas que ocorre por volta do sexto mês de vida. No cromossoma 11, localiza-se o gene da globina beta S e há uma substituição de uma base nitrogenada do códon GAC para GTG, resultando na substituição do ácido glutâmico (glu) pela valina(val) na posição número 6 da globina beta. A valina é um aminoácido neutro(pI~6) e o ácido glutâmico é carregado negativamente(pI =2,8). Essa troca altera o pI da hemoglobina, tornando-a carregada menos negativamente(pI da Hb A = 6,8; pI da HbS >6,8) fato que resulta em uma mobilidade mais lenta da Hb S, quando comparada com a hemoglobina A em eletroforese alcalina(pH 8,0 a 9,0). A troca de aminoácidos que resulta na produção da hemoglobina S abala estruturalmente a molécula, pois se na Hb A o ácido glutâmico da posição 6 da globina beta auxilia no afastamento das moléculas desoxigenadas de hemoglobinas, a entrada da valina nesta posição favorece a polimerização sob condições de

baixo teor de oxigênio. No estado oxigenado a molécula de Hb S está “relaxada”, e nessa conformação estrutural as globinas beta S estão mais separadas. No estado desoxigenado, a molécula de Hb S torna-se polimerizada ou “tensa” e as globinas beta S ficam mais próximas. Essa mudança de conformação favorece o contato entre as regiões de desoxihemoglobina, o que não é possível no estado oxigenado. Por meio da união de vários tetrâmeros de Hb S (nucleação), forma-se um número considerado de moléculas agregadas que gera longos polímeros alterando a morfologia do eritrócito para a forma “afoiçada”. Nesta etapa há a mudança do estado líquido e solúvel para o estado sólido e insolúvel, alterando-se a viscosidade da solução e formando-se cristais de Hb S, os “tactóides”. Essa alteração do estado solúvel para o insolúvel é a diferença mais significativa sob o ponto de vista patológico da presença da Hb S. (21)

A anemia falciforme é a doença hereditária monogênica mais comum do Brasil e uma das mais frequentes da humanidade.(33). Possui caráter genético autossômico recessivo e é comum para ambos os sexos. (30) Caracteriza-se por frequentes crises hemolíticas e trombóticas, com episódios de dor e que levam, com várias exceções, a invalidez ou semi-invalidez dos portadores, culminando com a morte precoce.(22)

O termo doença falciforme – “sickle cell disease” - foi empregado pela primeira vez, em 1922, por Manson. Este autor relacionou, inclusive, algumas características comuns entre os portadores dessa doença: Todos eram da raça negra, apresentavam icterícia, fraqueza, úlceras de membros inferiores, anemia intensa, reticulocitose e eritrócitos falcizados no sangue periférico.(21) Hoje é sabido que esta doença existe tanto em caucasóides como em negróides.

Sua distribuição é ampla, abrangendo todos os continentes, notadamente a África, a América do Norte e a América Latina. (21)

O gene da Hb S alcança sua máxima incidência na África Tropical, mas também pode ser observado entre Árabes, Italianos e Gregos. (12,23,32,9) O gene foi introduzido na América pelo tráfico de escravos negros, e sua distribuição no continente é heterogênea de acordo com a quantidade de negros e mulatos na população. (3)

O Brasil apresenta uma população com origens raciais diversas e bem conhecidas, que tem miscigenação em diferentes graus de intensidade. Esse fato permite a dispersão de genes outrora característicos de determinadas populações e regiões definidas. Esses genes foram transmitidos gradualmente à população nativa brasileira, à medida que se intensificava o processo de colonização em nosso país. (28, 18). Assim acredita-se que a contínua atividade

miscigenatória tenha facilitado a propagação das hemoglobinas anormais, e cuja heterogênea distribuição pode ser explicada conforme a região colonizada e a proveniência nacional dos seus colonizadores. (18)

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), a cada ano nascem no Brasil cerca de 2.500 crianças portadoras de doença falciforme.(21)

A Hb S polimerizada distorce o eritrócito. Da forma originalmente bicôncava ele se torna alongado, assume a forma característica de foice e produz uma série de eventos que encurtam a sobrevivência da célula e impedem seu fluxo na microcirculação.

As deformações celulares que ocorrem no processo da falcização alteram as trocas iônicas, afetam a permeabilidade celular e, como consequência, surgem lesões na membrana, o que também contribui para encurtar a vida das células. Esse processo pode ser reversível com a oxigenação celular. Contudo, após repetidos episódios, a célula torna-se irreversivelmente falcizada. Os eritrócitos falcizados são rapidamente retirados da circulação, principalmente por macrófagos do sistema reticuloendotelial. Ainda, como consequência do processo de falcização, os eritrócitos falcizados aderem com muita facilidade ao endotélio vascular, contribuindo para os episódios de vaso-oclusão associados a essa doença.(8)

Os fenômenos vaso-oclusivos acontecem principalmente em órgãos com circulação sinuosa, onde o fluxo de sangue é lento e a tensão de oxigênio e o pH são baixos (rim, baço, medula óssea) ou naqueles com um suprimento sanguíneo arterial terminal limitado (olhos, cabeça do fêmur). A hipóxia decorrente da oclusão vascular gera infartos teciduais e orgânicos e proporciona, principalmente, sintomatologia de dor ou danos teciduais crônicos irreversíveis em alguns órgãos. (21)

O curso clínico da doença varia desde formas extremamente graves, com morte súbita na infância ou repetidas complicações, até casos com uma evolução muito benigna, quase isenta de manifestações clínicas. (33)

Essa variabilidade depende, em primeiro lugar, de determinantes ambientais; são principalmente fatores de ordem sócio-econômica, como acesso à assistência médica, qualidade de alimentação, higiene, habitação e prevenção de doenças infecto-contagiosas. O processo de falcização está também associado a tensão de oxigênio, concentração intracelular da Hb S, temperatura, e associação com outras hemoglobinas e talassemias (21).

A influência de outras hemoglobinas sobre a polimerização da hemoglobina S é variável. Vários dos estados duplamente heterozigoto para Hb S e um segundo distúrbio da síntese de Hb são caracterizados por aberrações clínicas e hematológicas que , até certo ponto,

simulam as características da anemia falciforme. Indivíduos homozigotos para hemoglobina S têm sintomas mais graves do que aqueles duplamente heterozigotos para hemoglobina S e hemoglobina C, que, por sua vez, são mais sintomáticos do que aqueles que têm hemoglobina S e ou hemoglobina D ou hemoglobina O Arab. (11)

A hemoglobina D é uma hemoglobina variante que possui mobilidade eletroforética idêntica a Hb S em pH alcalino, podendo ser separada desta por eletroforese em ágar pH 6,2 e também pode ser diferenciada por não provocar a falcização dos eritrócitos, bem como por ter solubilidade semelhante à Hb A. (21)

Por eletroforese em pH alcalino a posição da Hb D é ocupada por quase duas dezenas de hemoglobinas variantes. Entre essas hemoglobinas variantes, cinco foram classificadas como Hb D apesar de se diferenciarem bioquimicamente entre si: D Los Angeles, ou Punjab, foi caracterizada como uma mutação do resíduo 121 da cadeia beta (ácido glutâmico), sendo substituída pela glutamina – ou $\beta 121 \text{ glu} \rightarrow \text{gln}$; D Bushman: $\beta 16 \text{ gli} \rightarrow \text{arg}$; D Ouled Rabah: $\beta 19 \text{ asn} \rightarrow \text{lis}$; D Iran: $\beta 22 \text{ glu} \rightarrow \text{gln}$; D Ibadan: $\beta 87 \text{ tre} \rightarrow \text{lis}$. Dessas mutantes, conhecidas por Hb D, o tipo D Los Angeles, ou Punjab, é o mais prevalente, e sua frequência é próxima de 3% entre os habitantes do Noroeste da Índia. O estudo de polipeptídios da Hb D é insuficiente para diferenciá-las bioquimicamente. Apenas a análise dos aminoácidos do peptídio anormal é que permitirá a identificação definitiva do tipo de Hb D. Atualmente, com a utilização da eletroforese de focalização isoeletrica tem sido possível diferenciar a Hb D da Hb S, bem como a Hb D Los Angeles da Hb D Iran, entre outras que migram na mesma posição em eletroforese alcalina de acetato de celulose.(21)

A interação da Hb S com a Hb D foi descrita pela primeira vez por Itano, em 1951 (8), em uma família caucasiana americana. A Hb D é encontrada esporadicamente entre Caucasianos, Algerianos, Iranianos e Chineses; nos Negros sua incidência é de 0,1 à 0,85%, em Indianos a incidência varia de 2% nos Sikhs 1% nos Gujeratis. (31) Esta hemoglobina é encontrada em quatro associações: a mais comum é a heterozigose simples AD. Existe ainda a homozigose D, as associações beta-talassemia – D e hemoglobinaSD.(2)

A associação das hemoglobinas S e D é causa frequente de anemia moderada, do tipo hemolítica. Dentre as associações de Hb S com Hb D foram identificadas principalmente dois tipos de hemoglobinas D: A Hb D Punjab e a Hb D Ibadan. A associação entre Hb S e a Hb D Ibadan, geralmente não mostra sinais de doença falciforme(27), ao passo que a associação entre Hb S e Hb D Punjab cursa com anemia

hemolítica moderada e episódios de icterícia, dores ósseas e abdominais. Hepatoesplenomegalia e úlceras em membros inferiores também podem estar presentes.(2) Esta síndrome foi reconhecida em muitos indivíduos, a maioria de origem africana. Em cada um destes indivíduos as características clínicas e hematológicas foram as de anemia falciforme leve. (11)

A Hb S representa importante problema de saúde pública no Brasil, devido a sua alta incidência na população. Como os estados heterozigotos, via de regra, não são diagnosticados pelos exames de rotina, o casamento entre os mesmos dão origem a um elevado número de homozigotos, condição extremamente grave, que leva invariavelmente seus portadores à morte precoce. (2)

Portanto a diferenciação entre anemia falciforme e a associação entre HbS e HbD é de suma importância devido à absoluta diferença prognóstica.(2)

Partindo da observação clínica realizada junto aos pacientes falcêmicos atendidos nos serviços médicos especializados em Fortaleza (CE) que cursam com uma sintomatologia mais leve, resolvemos investigar 32 destes pacientes, representando cerca de 20% do universo de pacientes falcêmicos do estado do Ceará, com o intuito de refazer a eletroforese em pH alcalino (pH=8,6) e acrescentar a eletroforese em pH ácido (pH =6,2), pois é sabido que a hemoglobina D possui a mesma posição da Hb S em PH alcalino, entretanto diferem na corrida em pH 6,2 (ácido), logo é possível que pacientes portadores de hemoglobinopatia SD tenham sido diagnosticados erroneamente como portadores de anemia falciforme (Hb SS). Portanto somente com a corrida em pH 6,2 (ácido) poderá dirimir esta dúvida tão real.

O objetivo deste trabalho é confirmar o diagnóstico inicial dos pacientes ou descobrir uma nova e verdadeira condição hemoglobínica que justifique a presença de anemia falciforme com sintomas leves.

MATERIAL E MÉTODO

O desenvolvimento tecnológico para o estudo de proteínas, e em especial das hemoglobinas, verificado na década de 80 e metade dos anos 90, tem permitido a realização de diagnósticos laboratoriais cada vez mais sensíveis (21).

Dos exames laboratoriais possíveis de utilização em laboratório para a identificação de hemoglobinas anormais, a eletroforese constitui-se da principal técnica.

Define-se como eletroforese a migração de partículas dotadas de cargas elétricas (íons ou grupo de íons) quando colocadas em campo magnético. A migração indica o sinal da carga da partícula. Este sinal será oposto ao do pólo para onde irá migrar(13)

Este estudo foi realizado no Laboratório de Hemoglobina do Centro de Hematologia e Hemoterapia do Estado do Ceará (HEMOCE)

A população analisada foi composta de pacientes portadores de anemia falciforme, isentos de transfusão sanguínea a pelo menos dois meses antes da coleta do sangue e atendidos no serviço de hematologia do HEMOCE(24 pacientes) e no serviço de Hematologia do Hospital Infantil Albert Sabim (H.I.A.S) (8 pacientes), no período de 10 de janeiro à 14 de fevereiro de 2000 .

Foi coletado de cada paciente 5 ml de sangue, usando como tubo coletor o vacutainer da marca BD tendo como anticoagulante o EDTA.

Foram feitos de cada amostra dois hemolisados , um rápido usando saponina 1%(usado para eletroforese em pH alcalino), e outro hemolisado usando clorofórmio (usado para eletroforese em pH ácido).

Os pacientes foram observados cuidadosamente para não terem suas amostras de sangue coletadas caso tivessem recebido transfusão sanguínea no período mínimo de 3 meses.

PREPARAÇÃO DOS HEMOLISADOS

1. Hemolisado para eletroforese em pH em fitas de acetato de celulose:

O hemolisado feito foi do tipo rápido , este procedimento técnico é recomendado para estudo populacional (21).

PROCEDIMENTO

- Em placa de Kline misturou-se 20nl de sangue do paciente com 2 gotas de solução de saponina à 1%.

2. Hemolisado para eletroforese em pH ácido:

PROCEDIMENTO

- Centrifugou-se 2ml de sangue do total da amostra à 1500rpm por 5 minutos; removendo-se o plasma. Os eritrócitos foram lavados 3 vezes com solução salina à 0,85%. na última centrifugação o sobrenadante foi desprezado.
- Ao volume de eritrócitos lavados, adicionou-se o mesmo de água destilada. Homogeneizou-se e após 15 minutos adicionou-se um volume de clorofórmio idêntico ao hemolisado formado. Agitou-se vigorosamente o tubo com a mistura e após 24 horas na geladeira foi centrifugado novamente por 15 minutos à 2000rpm.
- A solução de hemoglobina sobrenadante, ou hemolisado, foi retirada por meio de pipeta pasteur e transferida para frasco limpo.

ELETROFORESE

As eletroforeses de hemoglobinas, em especial as alcalinas, constituem-se na principal técnica de identificação da maioria das hemoglobinas anormais.

Durante a eletroforese é importante o uso de, pelo menos, uma amostra controle. A amostra usada como controle em pH alcalino foi de hemoglobina AS (traço falciforme) e a amostra usada como controle em pH ácido foi de hemoglobina AA (normal), pois é sabido que a hemoglobina D possui a mesma posição da hemoglobina A em pH ácido.

1. Eletroforese qualitativa em acetato de celulose pH 8,0-9,0:

Na eletroforese em acetato de celulose PH 8,0-9,0 a hemoglobina é uma proteína carregada negativamente, migrando em direção ao polo positivo. Este método identifica as hemoglobinas normais e grande parte das variantes. As diferentes mobilidades verificadas entre as diferentes hemoglobinas com defeitos estruturais se devem as alterações de cargas elétricas causadas por substituições de aminoácidos de diferentes pontos isoeletricos (pI). (21)

Acetato de celulose é um meio de fracionamento de substâncias que se processa com ligeireza e eficiência . As vantagens do acetato de celulose são as seguintes: (21)

- a) A absorção das substâncias analisadas se processa homogeneamente devido as suas porosidades e composição química relativamente pura
- b) Fracionamento rápido
- c) Aplicação de pequenas quantidades de amostras sem perder a sensibilidade analítica
- d) Transparentização

EQUIPAMENTO

- (a) Cuba de eletroforese e fonte geradora de voltagem
- (b) Tiras de acetato de celulose da marca celm(cellogel)
- (c) Papel absorvente
- (d) Aplicador de amostras

REAGENTES

1. Solução Tampão: Tris-EDTA -Borato 0,025m pH 8,5

Tris (hidroximetil) Aminometano.....	10,2g
Ácido Etileno-Diamino-Tetracético.....	0,6g
Ácido Bórico.....	3,2g
Água destilada q.s.p.....	1 litro
2. Solução corante : Ponceau

Ponceau S.....	0,5g
Ácido Tricloroacético.....	5,0g
Água destilada q.s.p.....	100ml
3. Solução descorante

Ácido Acético Glacial.....	100ml
Metanol.....	50ml
Água destilada q.s.p.....	1 litro

PROCEDIMENTO

- Colocar igual quantidade de tampão em cada compartimento eletrolítico da cuba de eletroforese;
- Embeber o acetato de celulose na solução tampão, previamente colocada em uma vasilha, pelo menos durante 15 minutos.
- Enxugar o acetato de celulose entre duas folhas de papel absorvente para remover o excesso de solução tampão;
- Ajustar as tiras de acetato de celulose na cuba de eletroforese, deixando-as esticadas. Verificar se as duas extremidades estão mergulhadas na solução tampão de cada compartimento da cuba;
- Aplicar as amostras nas tiras de acetato de celulose (hemolisado com saponina à 1%, ou solução de hemoglobina) a 2cm do compartimento do polo negativo (catodo). Não esquecendo de aplicar o padrão ou amostra controle AS .
- Passar 200 ou 300 volts por trinta ou vinte minutos, respectivamente;
- Analisar o fracionamento, inicialmente sem corar;
- Remover as tiras e corar com ponceau (ou outro corante de proteínas) por 10 minutos, no mínimo;
- Transferir as tiras para a vasilha que contém solução descorante, agitando-a cuidadosamente por 3 a 5 minutos. trocar a solução descorante usada por outra limpa, e deixar as tiras por tempo necessários para clarea-las.

2. Eletroforese em ágar pH 6,2

O emprego da eletroforese em ágar pH 6,2 é específico para diferenciar alguns tipos de hemoglobinas mais lentas que a hemoglobina A, quais sejam: Hb S da Hb D e Hb C da Hb E, que migram em posições similares em eletroforese alcalinas. Por esta técnica as hemoglobinas S e C separam-se da Hb A, enquanto as hemoglobinas D e E migram na mesma posição da Hb A. (21)

EQUIPAMENTO

- (a) Cuba de eletroforese fonte geradora de voltagem
- (b) Filmes de ágar ácido para separação eletroforética das hemoglobinas em pH ácido da marca celm (celmgel)
- (c) Pipeta de 1ml

REAGENTES

1. Solução Tampão Fosfato pH 6,2

NA HPO	2,02g
NAH PO . H O	7,66g
Água destilada q.s.p.....	100ml

2. Solução corante: Ponceau

Ponceau S	0,5g
Ácido Tricloroacético.....	5,0g
Água destilada q.s.p	1 litro

3. Solução descorante

Ácido Acético Glacial.....	100ml
Metanol.....	50ml
Água destilada q.s.p.....	1 litro

PROCEDIMENTO

- Retirar o gel do envelope e colocá-lo para cima
- Retirar o suporte plástico e aplicar o hemolisado no pocinho, com auxílio de uma pipeta ou capilar
- Colocar a placa de gel de modo invertido na cuba entre o suporte. colocar o lado onde foi aplicada a amostra do lado do polo positivo
- Correr 90v por aproximadamente 1 hora
- Retirar o gel e corar com ponceau S por 5 minutos e transferir para um recipiente com solução descorante
- Analisar o fracionamento

RESULTADOS

TABELA 1– Perfil eletroforético dos 32 pacientes analisados em pH alcalino e ácido no período de 10/01/00 à 14/02/00 .

PACIENTES	PADRÃO ELETROFORESE	
	pH ALCALINO (8,6)	pH ÁCIDO(6,2)
ACPC	Hb SS	Hb SS
AL	Hb SS	Hb SS
CACS	Hb SS	Hb SS
CBN	Hb SS	Hb SS
DTA	Hb SS	Hb SS
EBLF	Hb SS	Hb SS
EBN	Hb SS	Hb SS
EFN	Hb SS	Hb SS
SEM	Hb SS	Hb SS
ERNS	Hb SS	Hb SS
FA	Hb SS	Hb SS
FA	Hb SS	Hb SS
FACP	Hb SS	Hb SS
FL	Hb SS	Hb SS
FAZ	Hb SS	Hb SS
FPS	Hb SS	Hb SS
ILS	Hb SS	Hb SS
IRS	Hb SS	Hb SS
JAS	Hb SS	Hb SS
JNP	Hb SS	Hb SS
LOS	Hb SS	Hb SS
LOS	Hb SS	Hb SS
LSG	Hb SS	Hb SS
MAC	Hb SS	Hb SS
MÊS	Hb SS	Hb SS
MHSS	Hb SS	Hb SS
MLT	Hb SS	Hb SS
MNS	Hb SS	Hb SS
MSR	Hb SS	Hb SS
SAS	Hb SS	Hb SS
SWAM	Hb SS	Hb SS
TFO	Hb SS	Hb SS

TABELA 2–Demonstração dos controles usados na eletroforese em pH alcalino 8,6 dos 32 pacientes analisados.

PACIENTES	CONTROLE	PERFIL
ACPC	Hb AS	Hb SS
AL	Hb AS	Hb SS
CACS	Hb AS	Hb SS
CBN	Hb AS	Hb SS
DTA	Hb AS	Hb SS
EBLF	Hb AS	Hb SS
EBN	Hb AS	Hb SS
EFN	Hb AS	Hb SS
SEM	Hb AS	Hb SS
ERNS	Hb AS	Hb SS
FA	Hb AS	Hb SS
FA	Hb AS	Hb SS
FACP	Hb AS	Hb SS
FL	Hb AS	Hb SS
FAZ	Hb AS	Hb SS
FPS	Hb AS	Hb SS
ILS	Hb AS	Hb SS
IRS	Hb AS	Hb SS
JAS	Hb AS	Hb SS
JNP	Hb AS	Hb SS
LOS	Hb AS	Hb SS
LOS	Hb AS	Hb SS
LSG	Hb AS	Hb SS
MAC	Hb AS	Hb SS
MÊS	Hb AS	Hb SS
MHSS	Hb AS	Hb SS
MLT	Hb AS	Hb SS
MNS	Hb AS	Hb SS
MSR	Hb AS	Hb SS
SAS	Hb AS	Hb SS
SWAM	Hb AS	Hb SS
TFO	Hb AS	Hb SS

TABELA 3 – Demonstração dos controles usados na eletroforese em pH ácido 6,2 do 32 pacientes analisados .

PACIENTES	CONTROLE	PERFIL
ACPC	Hb AA	Hb SS
AL	Hb AA	Hb SS
CACS	Hb AA	Hb SS
CBN	Hb AA	Hb SS
DTA	Hb AA	Hb SS
EBLF	Hb AA	Hb SS
EBN	Hb AA	Hb SS
EFN	Hb AA	Hb SS
SEM	Hb AA	Hb SS
ERNS	Hb AA	Hb SS
FA	Hb AA	Hb SS
FA	Hb AA	Hb SS
FACP	Hb AA	Hb SS
FL	Hb AA	Hb SS
FAZ	Hb AA	Hb SS
FPS	Hb AA	Hb SS
ILS	Hb AA	Hb SS
IRS	Hb AA	Hb SS
JAS	Hb AA	Hb SS
JNP	Hb AA	Hb SS
LOS	Hb AA	Hb SS
LOS	Hb AA	Hb SS
LSG	Hb AA	Hb SS
MAC	Hb AA	Hb SS
MÊS	Hb AA	Hb SS
MHSS	Hb AA	Hb SS
MLT	Hb AA	Hb SS
MNS	Hb AA	Hb SS
MSR	Hb AA	Hb SS
SAS	Hb AA	Hb SS
SWAM	Hb AA	Hb SS
TFO	Hb AA	Hb SS

FIGURA 1

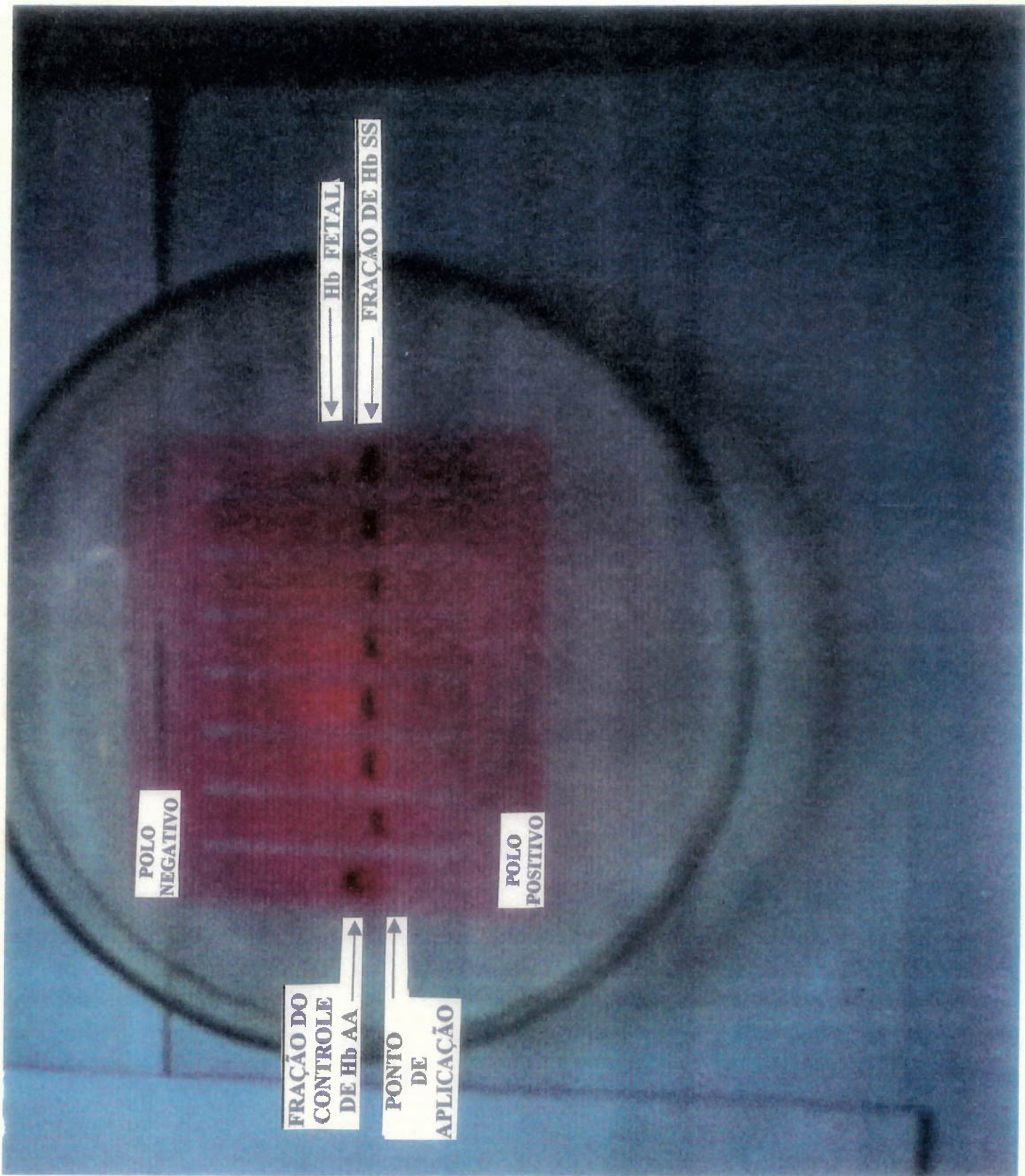


FIGURA 2

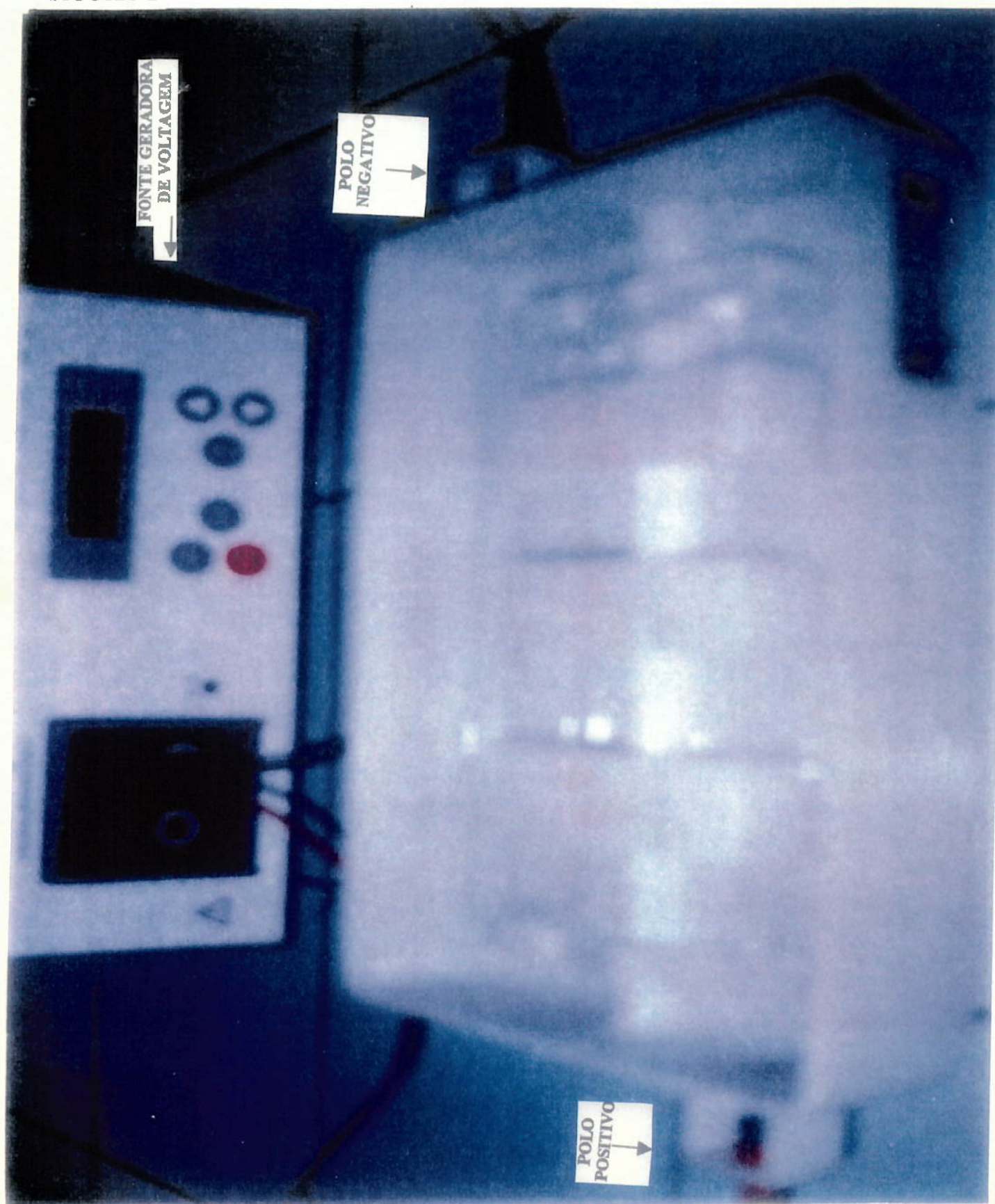


Figura 1- Demonstração da placa de pH ácido da Celm contendo amostras de 7 pacientes comprovadamente falciformes. Corada com Ponceau S e mostrando como controle a fração de hemoglobina AA (normal). A corrida foi feita do polo positivo para o negativo.

Figura 2- Demonstração da fonte geradora de voltagem e cuba eletroforética apresentando fitas de acetato de celulose da marca Celm, devidamente prontas para aplicação das amostras dos pacientes. Esta fonte eletroforética realiza eletroforeses tanto em pH alcalino quanto em pH ácido.

DISCUSSÃO

A incidência de distintos genótipos depende da frequência dos genes anormais da população e a facilidade com que os portadores dos diferentes genes se entrecruzam(35).

Em nossa pesquisa não foram encontrados pacientes portadores das associações da hemoglobina S com hemoglobina D, ou seja, hemoglobinopatia SD.

Os pacientes portadores de anemia drepanocítica com sintomatologia leve possivelmente está associado a um nível elevado de Hb Fetal .

ZAGO, M.A E COL (1979), demonstraram que a heterogeneidade dos níveis de Hb Fetal de adultos normais é determinada geneticamente; adultos “normais” podem ter níveis claramente elevados de Hb Fetal (acima de 3%). A mesma heterogeneidade é observada em pacientes com anemia falciforme, propiciando níveis decididamente elevados em alguns pacientes.

ZAGO, M. A E COL (1993), relatou que o curso clínico da doença falciforme varia desde formas extremamente graves, até casos com uma evolução muito benigna; citando pelo menos 3 fatores genéticos importantes para determinação da gravidade clínica: a) concentração de Hb Fetal ; b) o haplótipo associado ao gene β^s ; c) a presença concomitante de deficiência de genes de globinas α (α -talassemia). Os mecanismos de ação desses fatores genéticos não são completamente independentes, resultando, em parte, da redução da concentração da Hb S no interior das hemácias; esta redução pode ser pela presença de outra hemoglobina (Hb Fetal, por exemplo), logo a tendência à falcização diminui e , consequentemente, a doença tem menor prognóstico.

NAOUM, P.C E COL (1997), descreve que embora considerável quantidade de informação esteja disponível com respeito à fisiopatologia da doença falciforme, ainda não temos uma boa explicação para a variabilidade clínica que ocorre com os seus portadores. É conhecido que a gravidade clínica da doença guarda relação direta com a intensidade e a frequência dos episódios de falcização irreversível e que é influenciada pela quantidade de Hb Fetal na célula. Pacientes com níveis elevados de Hb Fetal, como na concomitante persistência hereditária de Hb Fetal, apresentam uma evolução mais benigna da doença, devido ao efeito inibidor desta hemoglobina sobre a falcização.

Nos 32 pacientes estudados neste trabalho não foi encontrada a presença concomitante da mutação da hemoglobina S e D que poderia justificar as leves sintomatologias observadas no âmbito do acompanhamento clínico deste grupo de pacientes; Este fato é facilmente explicado pela baixa frequência de mutação da hemoglobina D na população negra, 0,1 à 0,85% relatado por OLIVEIRA, H.P E COL (1998). Igualmente devemos ressaltar a baixa densidade populacional da raça negra no Estado do Ceará, de ordem histórica, entretanto o trabalho além de confirmar todos os 32 pacientes como realmente portadores da hemoglobinopatia SS conclui exoticamente pelo estabelecimento de uma nova técnica na rotina do Laboratório de Hemoglobina do Hemoce, o qual é referência no Estado do Ceará, e que doravante poderá desenvolver estudos eletroforético de rotina em pH alcalino e ácido para todos os pacientes portadores de hemoglobinopatia S.

CONCLUSÃO

Os pacientes analisados neste estudo ($n = 32$) apresentaram um perfil eletroforético em pH alcalino 8,6 (técnica tradicional) de hemoglobina SS; tendo sido usado como controle , amostras de sangue com perfil eletroforético de AS (traço falciforme) .

Em pH 6,2 (ácido) todos os pacientes analisados ($n = 32$) exibiram igualmente um padrão eletroforético de hemoglobina SS, tendo sido usado como controle amostras de sangue com perfil eletroforético AA(hemoglobina normal) .

Portanto conclui-se que todos os 32 pacientes com hemoglobinopatia analisados por ambas as técnicas de eletroforese, quer em pH 8,6 e pH 6,2, exibiram o mesmo fenótipo de hemoglobina S, confirmando com toda certeza o diagnóstico clínico de Anemia Falciforme. Desfazendo assim a possibilidade real de se tratar de uma dupla heterozigose, no caso hemoglobinopatia SD; suspeitada em face dos quadros clínicos leves exibidos por este grupo de pacientes.

SUMMARY

Purpose: This study was done with the objective of realize a new eletrophoretic avaluation, now in pH 6,2, of 32 pacients with sickle cell disease of the HEMOCE an HIAS, to confirmate the initial simultaneous presence of sand D hemoglobin.

Methods: It was used two techiniques: eletrophoresis in alcalin pH (8,6) and electrophoresis in acid pH (6,2). The electrophoresis in acid pH was used to make diferenciation between the Hb S and Hb D, because both ocupe the same position in alkaline pH.

Results: A homogeneous eletrophoretic profile of hemoglobinopaty SS confirmed in acid pH was found in all pacients studiad, remoring the possibility of simultaneos presence of hemoglobin sand D in the same person.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AZEVEDO, E. S.; ALVES, A. F. P.; OLYMPIO DA SILVA, M.C.B.; SOUZA, M.G.F.; LIMA, A.M.V.M.D et AZEVEDO W.C. Distribution of abnormal hemoglobins and glucose-6-Phosphate dehydrogenase variants in 1200 school children of Bahia, Brazil. *Am J. Phys Anthropol*. v 53. p 509, 1980.
2. CAVALCANTI, A. S. Hemoglobinopatia SD: Estudo familiar. Revista do Instituto Estadual de Hematologia. Vol. 5. p 15-20, 1998.
3. COLOMBO, B.; MARTINEZ, G. "Haemoglobinopathies including thalassemia. Part 2. Tropical América". *Clin. Haemat.* v 10. p 730, 1981.
4. EMBURY, S.H.; DOZY, A.M.; MILLER, J.; DAVIES J.R.; KLEMAN, K.N.; PREISLER, H.; VICHINSKY, E.; LAUDE, W.N.; LUBIN, B.H.; KAN, Y.W. et MENTZER, W.C. Concurrent sickle cell anemia and α -thalassemia. Effect on severity of anemia. *N. Engl. J. Med.* v 306. p 270, 1992.
5. HIGGS, D. R.; ALDRIDGE, B.E.; LAMB, J.; CLEGG, J.B.; WEATHERALL, D.J.; HAYES, R.J.; GLADISON, Y.; LOWRIE, Y.; MASON, K.P.; SERJEANT, G.R. The interaction of alpha thalassemia and homozygous sickle cell disease. *N Engl J. Med.* 306:1441, 1982.
6. HURTZ, M. H.; SALZANO, F. M. Sickle cell anaemia in Rio de Janeiro, Brasil; demographic, clinic and laboratory data. *Braz J. Med. Biol Res*. v.16, p 219, 1983.
7. HUISMAN, T.H.J. Sickle cell anemia as a syndrome. A review of diagnostic features. *Am. J. Hematol.* v 6. p 173, 1979.
8. ITANO, H.A. Third abnormal hemoglobin associated with hereditary hemolytic anemia. *Proc. Nat. Acad. Sci.* v 37. p 775, 1951.
9. KONOTEY-AHULU, F.I.D.: "The sickle cell disease: clinical manifestation including the sickle crisis". *Arch. Intern. Med.* 133: 611, 1974.
10. KULOZIK, A.E.; KAR, B. C.; SATAPATHY, R.K.; SERJEANT, B.E.; SERJEANT, G. R.; et WEATHERALL, D.J. Fetal haemoglobin levels and β^s globin haplotypes in an Indian population with sickle cell disease. *Blood*, v 69, p 1742, 1987.
11. LUKENS, J. N. Hemoglobinopatias S, D, E & O: LEE, G. R et al. Wintrobe: Hematologia clínica, 9ª ed, São Paulo: Manole- 1999, vol 1. 38, 1161-1205.

12. LEHMANN, H.; HUNTSMAN, R. G. "Man's hemoglobin". *Amsterdam, North-Holland Publ.Co.*, 1974.
13. LIMA A. O. ; SOARES, B. J. ; GRECO J.B. ; GALIZZI J. ; CANÇADO J. R. Métodos de laboratório aplicados à clínica : Técnica e interpretação. 7ª ed. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan. 1992 .Cap.21 . p.24.
14. LIVINGSTONE, F.B. Frequencies of hemoglobin variants . Oxford . *Oxford University Press*, 1985.
15. MEARS, J.G.; LACHAMIAN, H.; LABIE, D. et NAGEL, R.L. Alpha- thalassemia is related to prolonged survival in sickle cell anemia. *Blood* 62: 286, 1983.
16. M.C. CURDY, P.R, et al. Haemoglobin S.G (S -D) syndrome. *Am. J. Med* , v. 57,p.665 -670, 1974.
17. MILNER , P.F.: "The sickling disorders". *Clin. Haemat.* 3: 289, 1974.
18. NAOUM, P. C.. Anemias imigrantes. Origem das anemias hereditárias no Brasil. *Ciência Hoje* 3: 58 , 1984.
19. NAOUM, P.C; DOMINGOS, C.R.B; GOMES, C.T; CASTILHO, E. M; MORAIS, J.S. Evidências das dificuldades no diagnóstico das hemoglobinopatias obtidas pelo Centro de Referência de Hemoglobinopatias. *Bol. Soc. Bras. Hematol. Hemot.* 9: nº 146 : 202-206, 1987.
20. NAOUM, P.C; DOMINGOS, C.R.B; MAZZIERO, P.A; CASTILHO, E.M; GOMES, C.T. Hemoglobinopatias no Brasil. *Bol. Sol. Bras. Hematol. Hemoterapia* – vol. 8 (nº141): p180-188; 1986.
21. NAOUM, P. C. Hemoglobinopatias e talassemias . – São Paulo: Savier , 1997.
22. OLIVEIRA ,H.P. Hematologia Clínica 2ª ed. Rio de Janeiro, Ateneu, 1983, P 167.
23. PERRINE ,R.P. ; PEMBREY, M.E. ; JOHN, P.; PERRINE, S. ; SHOUP, F. "Natural history of sickle cell anemia in Saudi Arabs . A study of 270 subjects". *Ann. Intern Med.* 88:1, 1978.
24. POWARS , D.R. ; CHAN, L. et SCHROEDER, W.: β^s - Gene- cluster haplotypes in sickle cell anemia : Clinical implications. *Am J Ped Hematol.* 12: 367, 1990.
25. POWARS ,D.R.. Sickle cell anemia : β^s - Gene – cluster haplotypes as prognostic indicators of vital organ failure. *Semin. Hematol.* 28: 202, 1991.
26. RAMALHO, A.S; MARTINS C.S.B; O diagnóstico pré-natal das hemoglobinopatias. *Bol. Sol. Bras. Hematol. Hemot.*- vol.8 . nº 141. p177-179;1986

27. RINGELHAN, B. et. al. Sick cell haemoglobin D Punjab disease: S from Ghana and D from England. *Acta Haematol*, v.38, p. 324 –31 ,1967.
28. SALZANO , F. M. Em busca das raízes . *Ciência hoje*. 48, 1986
29. VELLA, F. Acid Agar-gel e eletroforese of human haemoglobin. *Am .J. Clin. Path.* 49: 440, 1968.
30. VERRASTIO T. ; LORENZI T. F. ; NETO S. W . Hematologia e Hemoterapia : Fundamentos de morfologia, fisiologia patologia e clínica. Atheneu, São Paulo . 1996. p68 - 70.
31. WASI ,P. et al . Haemoglobin D (beta) Los Angeles (D Punjab, α_2 , β_2 , 121 Glu NH₂) in Thai Family. *Acta Haematol*, v.39, p. 151-158, 1968.
32. WEATHERALL, D.J.; CLEGG, J.B. "Thalassaemia syndromes". 2 nd ed. Oxford, *Black well Sci Publ.*, 1972.
33. ZAGO M. A. Origem e heterogeneidade da anemia falciforme. *Bol. Soc. Bras. Hematol. Hemot-* vol. 15, nº 162 p. 3-8, 1993
34. ZAGO M.A; COSTA F. F. Hereditary haemoglobin disorders in Brazil ; *Trans. R. Soc. Trop. Med. and hygiene*. v 79,p 385-388, 1985.
35. ZAGO M.A; COSTA F.F; ISMAEL ,S.J et BOTTURA, C.; Enfermedades drepanocíticas en una población brasileña. *Sangre* 28: 191- 1983