

Comparação entre a identificação da HB H, pelos métodos de precipitação e eletroforese.

Roberta Elisandra Ferreira Silva

A identificação da hemoglobina H é extremamente importante para avaliar amostras de pacientes portadores de talassemia alfa. Este trabalho se propõe comparar resultados de exames realizados pelo método de precipitação com o método de eletroforese. Foi realizado um estudo prospectivo e comparados os resultados, a partir de amostras de sangue total colhidas em EDTA de pacientes com hemoglobina de 7,0g/dl a 11,0 g/dl do Laboratório de Análises e Clínicas Santa Lucília em Uberaba MG, com objetivo de identificar o melhor método a ser utilizado. Dentre as 80 amostras realizadas pelo método de precipitação da Hb H em lamina, 77 foram confirmadas pelo método de eletroforese. A análise dos métodos conduz a afirmar que o método de eletroforese é mais confiável para determinar a Hb H.

Palavras-chaves: Identificação da hemoglobina H, métodos de precipitação e Eletroforese.

Introdução:

As talassemias constituem um grupo heterogêneo dentro das anemias hereditárias e que se caracterizam pela diversidade de manifestações clínicas e hematológicas.

A talassemia foi descrita pela primeira vez em 1925 por T. B. Cooley e P. Lee em paciente com grave quadro de anemia, esplenomegalia e alterações ósseas. Por muito tempo essa forma grave de talassemia foi denominada de anemia de Cooley em homenagem ao seu principal descobridor. Posteriormente observou-se que a anemia de Cooley era freqüente entre italianos, gregos e árabes, cujos países são banhados pelo mar mediterrâneo e assim, a anemia de Cooley passou também a ser conhecida por anemia do mediterrâneo, porque mar, em grego, é conhecido por “talassa”. (Naoum,1999)

Em 1955, foi descrita pela primeira vez nos Estados Unidos e na Grécia uma nova hemoglobina rápida que denominaram de Hb H, com características instáveis, formando corpúsculos de inclusões nos eritrócitos e visualizadas quando submetida á incubação com corantes vitais. Esses achados estavam associados às alterações morfológicas dos eritrócitos, desde que afastada as possibilidades de que a anemia microcítica e hipocrômica fosse devido à deficiência de ferro. A identificação de que a hemoglobina H era composta por tetrâmeros de cadeia beta, realizadas por técnicas de hibridização e por análises bioquímicas, sugeriu que

se tratava de uma doença causada por defeitos nos genes alfa. A hemoglobina H tem afinidade ao oxigênio dez vezes maior que a hemoglobina A, ausência de efeito Bohr e liga-se ao cromo mais rapidamente do que a hemoglobina A. (Naoum,1997)

As talassemias alfa são diferenciadas e classificadas de acordo com o número de genes alfa lesados, com a importante observação de que o grau de lesão pode ser variável, afetando o gene parcial ou totalmente. De uma forma geral, as síndromes alfa talassemicas são classificadas em: portador "silencioso" (ou talassemia alfa mínima), traço alfa talassemico (ou talassemia alfa menor), doença de hemoglobina H (ou talassemia alfa intermediária) e hidropsia fetal.

Segundo Naoum,1997, a sinopse geral da relação entre a deleção dos genes alfa e conseqüências fisiopatológicas, são as constantes da tabela 1.

Tabela 1- Síndromes alfa talassêmicas.

| Tipo de talassemia | Deleção do gene | Alterações Hematológicas | Alterações Clínicas | Alterações laboratoriais |
|------------------------|---|--|--|---|
| Portador silencioso | (-, α/α .) | Discreta microcitose ou normocitose VCM: 75-80 HCM: 24-27 | Nenhuma | Traços de HbH Na eletrorforese P.I.E. 1/1000 a 2000 |
| Traço alfa talassêmico | (-, -/ α α) (-, α /-, α) | Microcitose hipocromia anemia (Hb: 11-13g/dl) VCM: 65-75 HCM: 20-24 | Geralmente assintomático Talassemia Menor | Hb H: ~ 2% P.I.E. de Hb H: 1/250 a 500 |
| Doença de Hb H | (-, -/-, α) | Microcitose hipocromia anemia (Hb: 8-11g/dl) VCM: 55-65 HCM: 20-24 | Talassemia intermediária | Hb H: 10-20% P.I.E. de Hb H: Em todos os campos do microscópio |
| | (-, -/-, -) | Anisocitose Poiquilocitose Eritroblastose Anemia (Hb: <7g/dl) VCM: 100-110 HCM: diminuído | Morte neonatal | Hb Bart's: 80-100% Hb H: 10-20% |

P.I.E.: Pesquisa intra- eritrocitária.

Artigo de conclusão de curso de pós- graduação em Hematologia Laboratorial (Maio de 2007 a junho de 2008).Endereço para correspondência: AVENIDA Cristo Rei,664,Parque das Américas,664,CEP38045250, Uberaba-MG.E-mail:robertaefsilva@uol.com.br

Finalmente é importante destacar que as hemoglobinas H e Bart's apresentam alta afinidade pelo oxigênio, tornando sua liberação para as células e tecidos muito lenta e dificultosa, e como resultado causa anoxia tecidual. Da mesma forma, os graus de hemólise e de anemia também estão na dependência da quantidade de hemoglobina H precipitada nos eritrócitos.

O presente estudo tem por objetivo analisar e comparar dois métodos para verificar a existência de correlação e assim liberar com maior confiabilidade.

Casuística e Método:

Foram coletadas 80 amostras de sangue periférico com anticoagulante (EDTA 5%). As amostras foram selecionadas aleatoriamente, com os seguintes critérios de escolha: pacientes anêmicos com hemoglobina entre 7,0g/dl a 11,0g/dl.

Estas Amostras foram codificadas e submetidas a testes de precipitação intra-eritrocitária usando coloração supravital com azul de crezil brilhante, examinadas em um microscópio com objetiva de imersão e analisadas e visualizadas em fita de eletroforese.

Os métodos utilizados foram os seguintes: teste de precipitação intra-eritrocitário com solução de azul cresil brilhante, e eletroforese de acetato de celulose pH 8,4-8,6.

Técnicas:

Segundo Naoum,PC,1999, Colocam-se 2 gotas de sangue total em um tubo com 3 gotas de solução azul de Crezil brilhante, incuba o material no banho Maria a 37°C, por 30 minutos, faz-se o esfregão e examina no microscópio. Devido às lamínas estarem ficando com muito precipitado do corante, ao invés de deixar no banho, foi colocado o material em repouso na temperatura ambiente por 2 horas. Já em eletroforese, Naoum, PC, 1999, coloca uma quantidade de solução tampão em cada compartimento eletrolítico da cuba de eletroforese, embebe o acetato de celulose na solução tampão, por 15 minutos, enxuga acetato de celulose entre duas folhas de papel absorvente para remover todo o excesso de solução tampão, ajusta as tiras, aplica o sangue hemolisado (50µl de sangue total com 50µl de saponina ou água), espera 7 minutos e analisa o fracionamento, sem corar. A técnica modificada, usei 100µl de sangue total com 50µl de saponina, justificando que, quanto maior a concentração melhor fica a visualização..

Resultados:

Dentre as 80 amostras comparadas pelos dois métodos no laboratório de análises e clínicas Santa Lucília em Uberaba MG, 77 obtiveram resultados iguais ao método de eletroforese. Ambos os métodos apresentaram resultados positivos e negativos para hemoglobina H.

Segundo Naoum, Paulo César, 1999, para confirmar um diagnóstico de Hb H, deve ser realizado os seguintes testes: eletroforese de hemoglobina em tampão TEB pH 8,4-8,6 e hemograma. A figura 1 nos mostra Eletroforese de hemoglobina em pH 8,6, a figura 2 nos mostra uma lamina com precipitados de hemoglobina H e hemácias microcíticas intensamente hipocrômicas, com células em alvo e poiquilocitose.

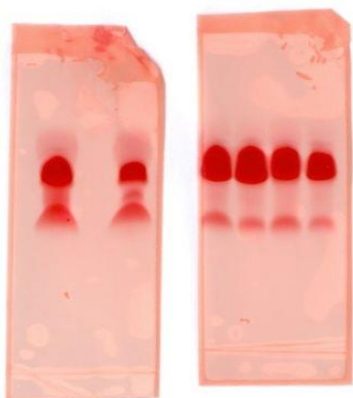


Tabela 1. Eletroforese de hemoglobina Em Acetato de celulose, tampão Tris-EDTA-Borato pH 8,6. Presença de Hb H.

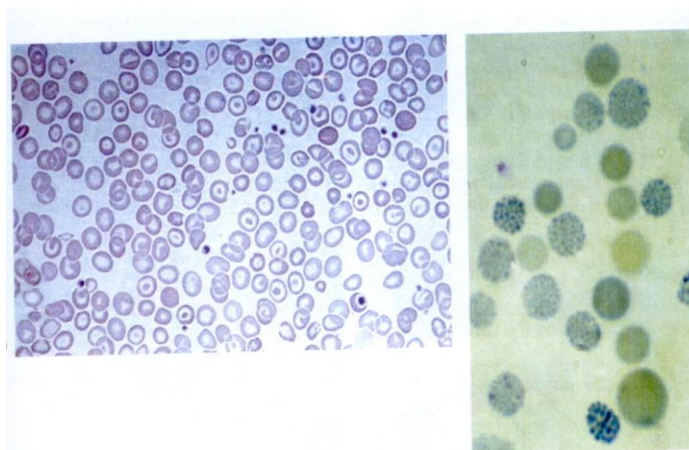


Tabela 2. A esquerda, Hemácias microcíticas intensamente hipocrômicas com células em alvo e poiquilocitose, à direita, Coloração supra vital com azul de crezil brilhante, intensamente corado (células em bola de golfe) causada por precipitação de agregados de cadeia de β -globina.

A presente pesquisa mostrou boa correlação de resultados, em comparação aos dois métodos utilizados.

Conclusão:

O presente trabalho mostra que o teste de eletroforese é de grande eficiência e confiabilidade. Conclui que em nosso laboratório deve ser usado o método de eletroforese, por apresentar resultado mais preciso.

Referências bibliográficas:

1. LICHTMANAM, BEUTLERE,KIPPS TJ, WILLIAN JW. **Manual de Hematologia de Williams**. 6°. ed. São Paulo, Artmed, 2005
2. NAOUM PC, **Hemoglobinopatias e Talassemias**.São Paulo.Sarvier, 1997.
3. ERDMANN FR,MEDEIROS M, PASQUINI R,FERREIRA E.**Hematologia clinica**.3°ed. Rio de Janeiro.Ateneu.1985.
4. NAOUM PC. **Diagnóstico das hemoglobinopatias**. Sarvier. São Paulo.1987.
5. A.V. HOFFBRAND. J,E. PETTIT.P.A.H.MOSS. **Fundamentos em Hematologia**. 4°ed.
6. NAOUM, PC. **Eletroforese Técnicas e Diagnósticos**. 2° ed. Santos Livraria e Editora. São Paulo.1999.