

Paulo Cesar Naoum

ELETROFORESES

- **Hemoglobinopatias**
- **Proteínas Séricas**
- **Lipoproteínas**
- **DNA**

Livraria Santos Editora Ltda., São Paulo

2010

Paulo Cesar Naoum é graduado em Biomedicina pela UNESP de Botucatu (1969). Especializou-se em bioquímica de proteínas no IVIC, Venezuela (1971). Doutorou-se em Ciências pela UNESP (1972) e fez pós-doutorado na Universidade de Cambridge, Inglaterra (1976-1977) e na Universidade de Roma (1986-1987). Tornou-se Livre-Docente pela UNESP (1983) e Professor Titular da UNESP (1989). Foi diretor da UNESP de São José do Rio Preto (1990-1994). Assessor da OMS (1988-1992) e do Ministério da Saúde (1990-1994). Atuou na pesquisa sobre os efeitos da poluição em Cubatão (1982-1988) e no mapeamento das hemoglobinopatias no Brasil (1978-2000), ambos com repercussão internacional. Foi pesquisador científico do CNPq e da OMS em hematologia (hemoglobinopatias). Premiado quatro vezes em nível nacional por entidades científicas brasileiras, publicou sete livros técnico-científicos (1987-2008) e vários trabalhos em periódicos especializados. É fundador e diretor da Academia de Ciência e Tecnologia de São José do Rio Preto desde 2000 e do CDA Laboratório desde 1988.

Colaboradores

Elisete Márcia Correa – Bacharel e Licenciada em Ciências Biológicas, Mestre em Ecologia e Recursos Naturais e Doutora em Ciências, área de concentração em Biologia Molecular. Professora do Centro Universitário Central Paulista – UNICEP.

Autora dos capítulos 18, 19 e 20 deste livro.

Patrícia A. Possik – Bacharel e Licenciada em Ciências Biológicas, Mestre em Genética e Evolução e Doutora em Ciências, área de concentração em Oncologia. É pós-doutorada no Netherlands Cancer Institute, Amsterdam, Holanda.

Autora dos capítulos 18, 19 e 20.

Flávio Augusto Naoum – Médico Hematologista, Mestre e Doutor em Hematologia, área de concentração em Hemoglobinopatias. Pós-doutorado pela Middlessex University of London, Londres, Inglaterra. É diretor clínico da Academia de Ciência e Tecnologia, de São José do Rio Preto, SP.

Co-autor dos capítulos 7, 8 e 9.

Paulo Francisco Naoum – Bacharel e Licenciado em Ciências Biológicas, Especialização em Biologia Molecular pela AC&T. É pesquisador científico da Academia de Ciência e Tecnologia de São José do Rio Preto, SP.

Co-autor dos capítulos 11 e 15.

Cristiane Gutierres Toledo Goulart – Biomédica, Especialização em Hematologia Laboratorial pela AC&T. Foi responsável pelo setor de eletroforese do CDA Laboratório e da Academia de Ciência e Tecnologia de São José do Rio Preto, SP, no período de 2004 a 2008.

Co-autora dos capítulos 11 e 15.

Ana Lúcia Gil Guimarães – Biomédica do CDA Laboratório de Análises Clínicas e responsável pelo setor de eletroforeses do CDA Laboratório e da Academia de Ciência e Tecnologia de São José do Rio Preto, SP.

Co-autora do capítulo 11.

Júnia Iannella Alves – Acadêmica de Farmácia e Bioquímica, estagiária do setor de eletroforeses do CDA Laboratório e da Academia de Ciência e Tecnologia de São José do Rio Preto, SP.

Co-autora do capítulo 11.

AGRADECIMENTOS

Para escrever o livro **ELETROFORESES – Hemoglobinopatias, Proteínas séricas, Lipoproteínas e DNA** foi preciso ter determinação, inspiração, conhecimento e colaboração.

Por estas razões eu aproveito este espaço para homenagear:
a determinação, que herdei dos meus pais
a inspiração, que consigo a todo momento ao lado da minha esposa e dos meus filhos
o conhecimento, que obtive dos meus professores e da minha determinação em busca-lo sempre
a colaboração, que me é dada constantemente pelos meus colegas e funcionários do CDA Laboratório e da Academia de Ciência e Tecnologia de São José do Rio Preto, SP.

O autor

PREFÁCIO

Em 1999 publiquei a segunda edição do livro “Eletroforese. Técnicas e Diagnósticos” que foi editado e distribuído pela Livraria Santos Editora Ltda. Passados dez anos dessa edição que, inclusive, esgotou-se, observei que a evolução científica e tecnológica desenvolvida no período provocou muitas mudanças. Apareceram novas tendências tecnológicas relacionadas ao uso da eletroforese na investigação laboratorial de inúmeras patologias, a biologia molecular tornou-se um meio eficiente para diversos tipos de estudos, surgiram novos conhecimentos científicos específicos, fatos que alteraram muitos conceitos e interpretações. Por essa razão estou propondo um novo livro sobre eletroforese, completamente reformulado e atualizado. Optei por abordar somente as relações entre eletroforeses com hemoglobinopatias, proteínas séricas, lipoproteínas e DNA. Confesso que foi muito empolgante re-estruturar completamente o tema eletroforese, e observei que cada vez mais é possível extrair dos seus resultados novas formas de investigações para a pesquisa e para o auxílio no diagnóstico médico de diversas patologias.

A participação de novos colaboradores foi fundamental para a adição de assuntos recentes que certamente empolgarão o leitor.

Ao finalizar este prefácio não poderia deixar de agradecer aos meus colaboradores e à bióloga Magaly S. Moraes Moretti que com extremo zelo e cuidado executou a datilografia deste livro.

São José do Rio Preto, março de 2010.

SUMÁRIO

Capítulo 01	<u>Introdução à eletroforese.</u>	01
Capítulo 02	<u>Princípios físico-químicos da eletroforese.</u>	07
	Introdução	07
	A migração eletroforética	13
	A eletroendosmose	16
Capítulo 03	<u>Tipos de Eletroforeses.</u>	18
	Acetato de celulose	18
	Gel de ágar ou agarose	19
	Gel de poliacrilamida	20
	Focalização isoeletrica	21
	Eletroforese capilar	23
Capítulo 04	<u>Revelação e quantificação das frações separadas por eletroforese.</u>	27
	Introdução	27
	Coloração e descoloração	28
	Eluição	29
	Densitometria	30
Capítulo 05	<u>Hemoglobinas normais.</u>	31
	A molécula	31
	Síntese genética	35
	As hemoglobinas normais	37
	Hemoglobinas embrionárias	42
	Hemoglobinas glicosiladas	44
Capítulo 06	<u>Hemoglobinopatias.</u>	47
	Introdução	47
	As hemoglobinas variantes	49
	Hemoglobinas variantes comuns no Brasil	55
	Hemoglobina D (Hb D)	57
	Hemoglobina G (Hb G)	61
	Hemoglobina Lepore (Hb Lepore)	62
	Listagem das hemoglobinas variantes	65
	Hb variantes similares à Hb A	66

Hb variantes similares à Hb Fetal	18	73
Hb variantes similares à Hb S		77
Hb variantes similares à Hb C		82
Hb variantes similares à Hb K		84
Hb variantes similares à Hb J		88
Hb variantes similares à Hb I		92
Hb variantes de Hb A ₂		95
Hb variantes de Hb Fetal		97
Análises eletroforéticas de hemoglobinas normais, anormais, variantes e associadas a talassemias		99
1 – Hemoglobinas A e A ₂		99
2 – Hb variantes comuns e raras		100
3 – Família com Hb S/Talassemia beta		103
4 – Hb H e Talassemia alfa		104
5 – Hb Instável (Hb Koln)		105
6 – Hb Instável polimerizada		107
7 – Hb Korle-Bu associada às talassemias alfa, beta ⁺ e delta		108
8 – Eletroforese de focalização isoeletrica para hemoglobinas		109
9 – Hb Porto Alegre		110
10 – Doença de Hb H e outras variantes comuns		111
11 – Hb Instável: Santa Anna – eletroforese		112
12 – Hb Instável: Santa Anna – corpos de Heinz		113
13 – Hb Instável: Santa Anna – Precipitação		114
Capítulo 07	<u>Doença Falciforme.</u>	115
	Fenótipos, genótipos e haplótipos	115
	Principais evidências clínicas	124
	Diagnóstico laboratorial da doença falciforme	126
	Hb AS – Traço falciforme ou falcemia heterozigota	139
	Hb SS – Anemia falciforme	142
	Interação Hb S/Talassemia beta	151
	Hb SD – Doença da Hb SD	157
	Hb SC – Doença da Hb SC	158

Capítulo 08	<u>Talassemias.</u>	160
	Introdução	160
	Talassemia alfa	162
	Portador “silencioso”	165
	Traço alfa-talassêmico	166
	Doença de Hb H	168
	Hidropsia fetal	170
	Base molecular da talassemia alfa	173
	Talassemia α^0	176
	Talassemia α^+	177
	Talassemia alfa adquirida	178
	Interação da talassemia alfa com mutantes estruturais de globina beta	179
	Interação talassemia alfa/talassemia beta	182
	Talassemia beta	183
	Fisiopatologia	189
	Talassemia beta homozigota (maior)	194
	Talassemia beta heterozigota	198
	Talassemia intermédia	201
	Interações entre talassemia beta e Hb variantes	201
	Talassemia beta-delta	202
	Associação entre talassemias beta e beta-delta	203
	Talassemia delta	204
	Persistência hereditária de Hb Fetal	205
	Base molecular da talassemia beta	206
	Análise da talassemia beta por técnicas moleculares	208
	Análise das mutações do gene beta por DGGE	212
	Diagnóstico laboratorial das talassemias beta	213
	Talassemia silenciosa	219
Capítulo 09	<u>Hemoglobinas Instáveis.</u>	221
	Introdução	221
	Bioquímica e fisiologia das hemoglobinas instáveis	222
	Formação de corpos de Heinz	223

	Oxidações e mecanismos de hemólise	227
	Características gerais das hemoglobinas instáveis	234
	Diagnóstico laboratorial	235
	Metodologia laboratorial específica	236
	Aspectos clínicos	240
Capítulo 10	<u>Análise laboratorial para o diagnóstico das hemoglobinopatias.</u>	244
	Introdução	244
	Primeira fase ou fase seletiva	245
	Segunda fase ou fase complementar	250
	Terceira fase específica para Hb raras	255
	Biologia molecular	259
Capítulo 11	<u>Técnicas laboratoriais.</u>	264
	Introdução	264
	Preparação de soluções de hemoglobina	264
	Eletroforese qualitativa em acetato de celulose pH 8,0 – 9,0	266
	Dosagem de Hb A ₂ por eletroforese em acetato de celulose pH 8,0 – 9,0	268
	Eletroforese em ágar pH 6,2	269
	Dosagem bioquímica de Hb Fetal	271
	Teste de precipitação para hemoglobinas instáveis	273
	Dosagens de metaemoglobina por absorção espectrofotométrica	277
	Pesquisa intra-eritrocitária de Hb H	280
	Teste para avaliar a fragilidade osmótica dos eritrócitos	282
Capítulo 12	<u>Proteínas plasmáticas ou séricas.</u>	286
	Introdução	286
	Metabolismo normal	287
	Avaliação laboratorial	290
Capítulo 13	<u>Proteínas plasmáticas de interesse clínico.</u>	294
	Introdução	294
	Componentes específicos	296

	Alterações eletroforéticas induzidas por patologias ou artefatos	306
Capítulo 14	<u>Doenças relacionadas com alterações das proteínas séricas e traçado eletroforético.</u>	309
	1 – Doença relacionada à dieta reduzida de proteínas	309
	1.1 – Desnutrição grave	309
	2 – Doenças relacionadas à perda protéica	311
	2.1 – Perda gastrointestinal	311
	2.2 – Queimaduras graves	313
	2.3 – Síndrome nefrótica	314
	3 – Doenças relacionadas à hepatopatias	316
	3.1 – Cirrose hepática	316
	3.2 – Hepatites virais	318
	4 – Alterações das proteínas plasmáticas nos processos inflamatórios	320
	4.1 – Inflamação aguda	320
	4.2 – Inflamação crônica	322
	5 – Alterações genéticas das proteínas plasmáticas	324
	5.1 – Disproteïnemia familiar idiopática	324
	5.2 – Hipogamaglobulinemia	325
	5.3 – Deficiência de alfa-1-antitripsina	326
	6 – Gamopatias monoclonais	328
	6.1 – Mieloma múltiplo	328
Capítulo 15	<u>Técnicas laboratoriais para análise das proteínas séricas ou plasmáticas.</u>	331
	Introdução	331
	Eletroforese em acetato de celulose	332
	Eletroforese em gel de ágar (agarose)	339
	Eletroforese em gel de poliácridamida	342
Capítulo 16	<u>Lipoproteínas.</u>	346
	Introdução	346
	Apolipoproteínas	351
	Deficiência genética de lipoproteínas	353

	Hiperlipoproteinemias hereditárias	357
	a – Deficiência Hereditária de Lipase Lipoprotéica	
	– Tipo 1	365
	b – Hipercolesterolemia Hereditária – Tipo 2a e 2b	365
	c – Hiperlipoproteïnemia Hereditária – Tipo 3	366
	d – Hipertrigliceridemia Hereditária – Tipo 4	367
	e – Hiperlipoproteïnemia Hereditária – Tipo 5	367
	f – Hiperlipidemia Hereditária Combinada	368
	Conclusão deste capítulo	369
Capítulo 17	<u>Técnicas laboratoriais para eletroforese de lipoproteínas.</u>	370
	Introdução	370
	Obtenção da amostra	371
	Eletroforese em gel de ágar	371
	Eletroforese em acetato de celulose	373
	Eletroforese em agarose (kits comerciais)	374
	Reagentes para eletroforeses em acetato e agarose	374
	Interpretação qualitativa	376
Capítulo 18	<u>Uma Breve História da Molécula do DNA.</u>	378
	A história	378
	Referências bibliográficas	387
Capítulo 19	<u>Testes Genéticos para Aplicação Médica e Não Médica.</u>	388
	Introdução	388
	PCR – Reação em cadeia da polimerase	394
	PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)	397
	Arranjos de DNA (DNA microarrays)	400
	Sexagem fetal	408
	Teste de paternidade	409
	Prática forense	414
	DNA mitocondrial, cromossomos Y e antropologia	416
	Referências bibliográficas	419

Capítulo 20	<u>A Análise de DNA por Eletroforese.</u>	422
	Eletroforese de DNA em gel	422
	Preparação do gel	423
	Aplicação das amostras	425
	Análise e registro dos resultados	427
	Fatores que influenciam a migração do DNA	428
	Interpretando o resultado de uma eletroforese em gel de agarose no diagnóstico da anemia falciforme	432
	Anexo: composição de tampões	435
	Referências bibliográficas	436
	Referências bibliográficas citadas nos capítulos 1 a 17	437
	Referências bibliográficas consultadas para escrever os capítulos 1 a 17	439
	Glossário técnico e pessoal	442

CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO À ELETROFORESE

A eletroforese é uma das técnicas analíticas mais importantes à disposição da investigação de proteínas, enzimas e DNA. Seu campo de aplicação é extensivo às diversas especialidades em clínica médica e pesquisas em biologia molecular, bioquímica, entre outras. A simplificação do seu uso e a melhoria de sua qualidade analítica tem permitido resultados com excelentes graus de reprodutibilidade e sensibilidade, além de torná-la cada vez mais difundida em laboratórios prestadores de serviços médicos.

Historicamente a eletroforese foi introduzida como meio de auxílio ao diagnóstico clínico em 1937 pelo bioquímico sueco **Arne Tiselius** quando publicou um trabalho científico relatando o fracionamento das proteínas séricas. Naquela época as eletroforeses eram realizadas em equipamentos similares às baterias de automóveis, em que as separações das frações ocorriam em meio líquido. Esse tipo de eletroforese era denominado por “eletroforese de fase líquida” e, por ser muito difícil e onerosa, sua aplicação ficou restrita à aplicação científica em reduzidíssimo número de instituições de pesquisas. Passados alguns anos, **Linus Pauling** e colaboradores publicaram em 1949 na revista Science a sua mais famosa descoberta – o fracionamento eletroforético da Hb S usando a eletroforese em papel de filtro. Com esta descoberta foi possível estabelecer que a Hb S, causadora da doença falciforme, era transmitida geneticamente de pais para filhos e se caracterizava como causa de uma doença molecular. A eletroforese em papel de filtro apesar do enorme tempo dispendido para fracionar proteínas, cerca de 12 a 18 horas de eletroforese, foi facilmente empregada no uso laboratorial para análises clínicas específicas nos estudos de proteínas séricas, lipoproteínas e hemoglobinas. Embora a eletroforese em papel apresentasse viabilidade de uso em rotina laboratorial, o seu desempenho na separação das frações era de baixa reprodutibilidade e a quantificação das frações era dificultada pela impossibilidade de transparentizar o papel. Entretanto, em

1953, os imunologistas franceses Curtis Willians e Pierre Grabar apresentaram um método eletroforético revolucionário para a época e que permitia a separação das frações proteicas associada com reações de precipitação com seus respectivos anticorpos. O novo método foi denominado por **imunoeletroforese** e se destacava dos outros por usar uma fina película de gel de agar espalhada sobre lâminas de vidro como suporte eletroforético. A adaptação desse método para a eletroforese de proteínas, enzimas, lipoproteínas e hemoglobinas foi um sucesso, pois permitia a quantificação por densitometria, com excelente resolução de reprodutibilidade e sensibilidade. O tempo de corrida eletroforética havia diminuído sensivelmente para aproximadamente quatro horas. Apesar disso, este tipo de eletroforese muitas vezes tinha o seu sucesso comprometido pela **eletroendosmose**, um processo físico-químico que interfere na corrida eletroforética em gel de agarose, e que tem influência conforme o grau de impureza do agar utilizado. A base desse método, inicialmente artesanal, foi padronizada a partir de 1970 e industrializada como gel de agarose. Pelo fato do suporte do gel de agar ter medidas reduzidas em comparação com a eletroforese em papel, o método passou a ter a denominação de eletroforese microzonal. Esse tipo de eletroforese permitia a aplicação de várias amostras de soro, plasma, líquido ou hemolisado de hemoglobinas num mesmo suporte de gel de agar, situação que tornava a análise viável economicamente para o uso na rotina laboratorial. Outro avanço obtido pela eletroforese em gel de agar foi a sensibilidade das avaliações quantitativas de suas frações, uma vez que se usava um suporte em lâminas de vidro (2,5 x 7,0 cm ou 5,0 x 7,0 cm) para sustentar a película do gel de agar. Esse conjunto formado por lâmina de vidro transparente e frações coradas, permitia excelente grau de determinação quantitativa por meio de um aparelho conhecido por **densitômetro**. A descoberta do gel de agar como meio eletroforético estimulou pesquisadores a buscarem outras opções de géis. Por essa razão foi descrito o método de gel de amido de autoria de Smithies em 1955, que foi considerada por longo período uma das técnicas padrão para

análises de proteínas, hemoglobinas e enzimas. O tamanho dos poros de gel de amido permitia a aplicação de grande quantidade de amostra, porém o tempo de migração demorava entre 12 e 15 horas, além de precisar de refrigeração para evitar que o gel fosse desfeito pelo calor dispendido durante a eletroforese. Essa técnica foi muito usada em estudos de hemoglobinopatias até os anos 70, quando foi substituída por outros métodos mais fáceis, rápidos e de boa sensibilidade analítica.

Neste mesmo período surgiu um novo tipo de gel conhecido por acrilamida e que foi descrito por Raymond e Weintraub em 1959. Logo a seguir surgiram adaptações e melhorias no método fato que possibilitou o início da eletroforese em gel de poliacrilamida. Quimicamente esse gel é o produto da polimerização da acrilamida (monômero) e da N, N' metilenobisacrilamida (ou bisacrilamida). A formação do gel de poliacrilamida ocorre por um mecanismo de polimerização vinílica, com auxílio de catalisadores. O polímero formado consiste de cadeias lineares de poliacrilamida, que incorporam uma pequena porção de moléculas de bisacrilamida, responsáveis pelo estabelecimento de ligações cruzadas intercadeias desses compostos químicos. A relação entre as quantidades de acrilamida e bisacrilamida determina as propriedades físicas do gel, tais como densidade, elasticidade, transparência e o tamanho dos seus poros. Geralmente os géis de poliacrilamida podem ser confeccionados na presença de sódio-dodecil-sulfato (SDS), fato que permite o fracionamento protéico altamente seletivo por meio do pH e do peso molecular das proteínas em estudo. Apesar do alto grau de resolução o seu uso na rotina de análises de amostras é economicamente dispendioso, por isso seu uso está restrito a pesquisas científicas.

Na busca de procedimentos práticos para a execução de eletroforeses destinadas à pesquisa e rotina laboratorial fez com que em 1963 surgisse um novo método de fracionamento de proteínas e enzimas e que tinha como suporte o acetato de celulose. Esse método publicado por Graham e Grunbaum facilitou universalmente o uso da eletroforese em laboratórios clínicos pela sua simplicidade e baixo custo, além de

permitir excelente grau de separação e quantificação das frações proteicas ou enzimáticas. Esse método foi sensivelmente melhorado quando os poros do acetato de celulose foram gelatinizados, surgindo daí o termo celogel ou cellogel.

No início dos anos sessenta surgiu um outro método de eletroforese que incluía na composição do gel de agar ou de poliácridamida um novo produto conhecido por anfólitos. Quimicamente os anfólitos são ácidos poliméricos sintéticos obtidos de poliaminoácidos, ácidos policarboxílicos ou ácidos polissulfônicos. O uso de anfólitos misturados a géis de agar e poliácridamida produz um gradiente de pH entre os pólos positivo (ânodo) e negativo (cátodo) que se dispõe como se fossem faixas milimétricas de pH em ordem crescente de pH, ex.: 6,0-6,1-6,2-6,3...10,0-10,1, etc. Ao aplicar amostras que contém diferentes proteínas com pHs específicos, elas reagem com o seu correspondente anfotérico e se precipita no gel, por exemplo, uma determinada proteína com pH 6,8 se precipita na faixa anfotérica específica de pH 6,8 (ou ponto isoelétrico – pI) interrompendo o seu deslocamento eletroforético, enquanto que as outras proteínas com pHs diferentes se deslocam eletroforéticamente até encontrarem seus correspondentes anfotéricos ou ponto isoelétrico específico. Esse método recebeu o nome de eletroforese de iso-focalização e sua aplicação tem se expandido em pesquisas e rotinas de análises laboratoriais de fracionamentos de produtos protéicos e enzimáticos devido ao seu notável grau de qualidade resolutive.

Ainda sob o ponto de vista da evolução cronológica dos métodos eletroforéticos, uma série de tentativas foi realizada a partir do início dos anos 80 com o objetivo de desenvolver processos automatizados e eficientes de eletroforese. Em 1986, Lauer e Mc Manigill publicaram um novo método denominado por eletroforese capilar e que se caracterizava pela formação de uma corrente eletrosmótica no interior de um tubo capilar conectado a dois reservatórios contendo soluções tampões, um deles representando o cátodo e outro o ânodo. O tubo capilar, com comprimento variável entre 70 e 100 cm e diâmetro interno

de 75 μ m tem sua parede interna revestida com um produto polimérico que a torna carregada negativamente quando submetida à corrente elétrica de alta tensão (> 500 volts). A corrente elétrica impulsiona também os íons positivos a fluírem no interior do tubo capilar. Dessa forma, a amostra submetida a este tipo de eletroforese se movimenta em fluxo **eletroendosmótico** em direção ao cátodo (pólo negativo). Portanto, a amostra submetida a esse processo eletroforético tem suas cargas elétricas interagindo com os íons positivos da solução tampão, bem como com os íons negativos da parede do tubo capilar. O fracionamento das micelas formadas pelas diferentes proteínas, enzimas ou pedaços de DNA são identificadas por um detector com capacidade de realizar leituras em comprimento de ondas variáveis entre 200 – 600 nm. Esse leitor registra graficamente a posição e a concentração das frações analisadas.

Atualmente pode-se dividir os procedimentos eletroforéticos em dois grandes grupos: manual e automatizado. No procedimento manual se usa sistemas abertos que permitem a manipulação quer seja do acetato de celulose ou dos géis de agarose e poliacrilamida, principalmente. Por outro lado, o procedimento automatizado pode ter sistemas abertos ou fechados. As eletroforeses automatizadas com sistemas fechados são tecnologicamente muito avançadas e destinadas a análises de grande número de amostras simultaneamente. Entretanto, os meios eletroforéticos atualmente disponíveis, independentemente de processos manuais ou automatizados e de sistemas abertos ou fechados, quando bem padronizados e executados, fornecem resultados com excelente nível de resolução (tabela 1.1).

De uma forma geral os métodos eletroforéticos disponíveis até o presente têm pelo menos duas aplicações bem definidas:

- 1 – O fracionamento de proteínas, enzimas e hemoglobinas que permitem estabelecer relações entre concentrações alteradas e/ou posicionamentos anormais de frações com patologias específicas;

- 2 – O fracionamento de segmentos de DNA previamente submetidos a métodos de biologia molecular que permitem estabelecer

genótipos e haplótipos de interesse clínico e antropológico, na resolução de casos de paternidade questionada e em medicina forense.

Enfim, a eletroforese é uma técnica que apesar de ter sido descrita há mais de 70 anos se mantém com métodos cada vez mais sofisticados para o uso laboratorial na rotina e na pesquisa científica.

Tabela 1.1: Aplicações e sensibilidade dos principais métodos eletroforéticos.

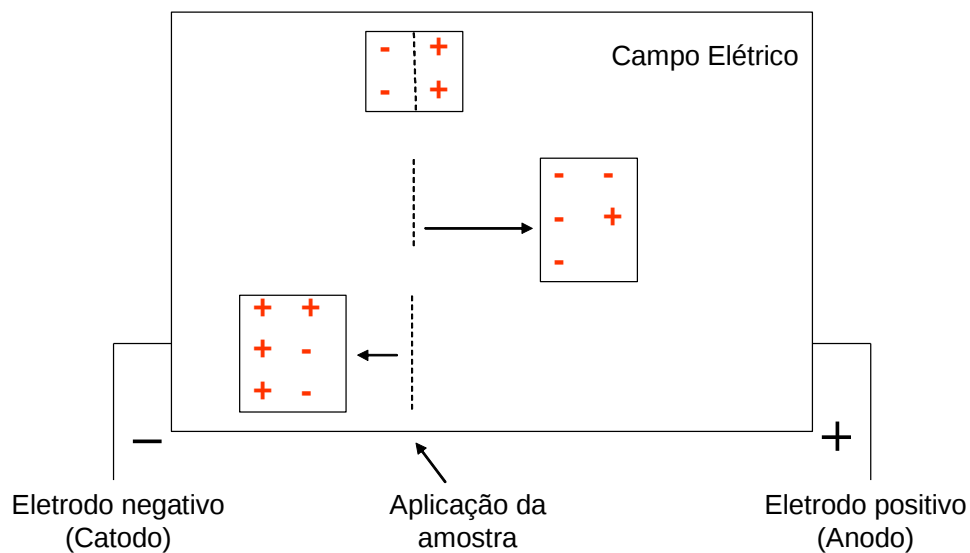
Método	Aplicação	Resolução
Acetato de Celulose	Rotina laboratorial	Boa
Gel de Agarose	Rotina laboratorial	Boa
Gel de Poliacrilamida	Pesquisa	Excelente
Isoeletrofocalização	"Screening ⁽¹⁾ " e Pesquisa	Excelente
Capilar Eletro-Osmótica	Rotina laboratorial	Excelente

(1) Selecionamento de alterações proteicas ou enzimáticos.

CAPÍTULO 2: PRINCÍPIOS FÍSICO-QUÍMICOS DA ELETROFORESE

Introdução

A explicação físico-química da eletroforese é relativamente simples. Emprega-se corrente contínua para separar os componentes do sangue, urina, líquor e outras soluções, aplicando uma corrente elétrica aos mesmos; quanto maior a corrente, maior será também a velocidade com que se moverá uma substância em relação à outra que tem em sua composição maior número de cargas elétricas positivas ou negativas nos aminoácidos que compõem as moléculas de proteínas ou de enzimas. Desta forma, os componentes com cargas elétricas equilibradas, permanecerão parados, enquanto que outros componentes mais carregados eletricamente se moverão em direção ao eletrodo de carga elétrica oposta, conforme o esquema abaixo:

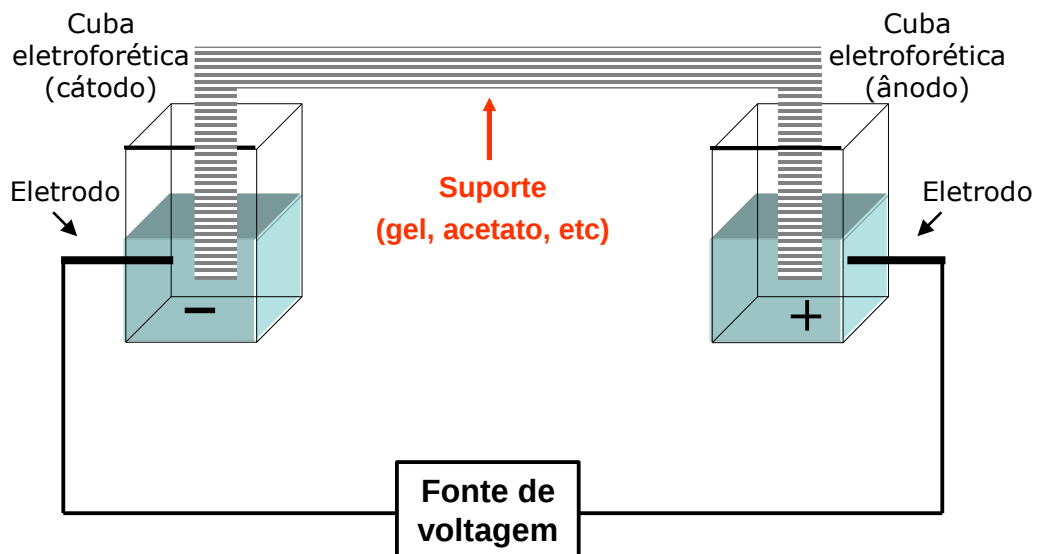


Os princípios da eletroforese têm por base os conhecimentos da química de proteínas e dos fatores físicos que determinam a movimentação de moléculas num campo elétrico. Denomina-se por campo elétrico o conjunto de sistemas que permite a movimentação de

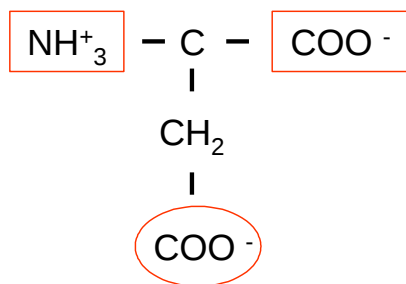
substâncias eletricamente carregadas. Resumidamente o conjunto de sistemas é composto por:

1. Suporte de fracionamento: acetato de celulose, gel de agarose, gel de poliacrilamida, tubos capilares, etc.
2. Cuba de eletroforese: equipamento composto por dois compartimentos, um com polaridade negativa (cátodo) e outro com polaridade positiva (ânodo), os quais são preenchidos com solução tampão.
3. Fonte de voltagem: equipamento que transforma corrente alternada em contínua e permite regular a intensidade da corrente, geralmente controlada por meio da voltagem ou da amperagem. Esse equipamento determina a polaridade (- ou +) dos compartimentos eletrolíticos da cuba de eletroforese.
4. Solução tampão: composto por água, sal básico e sal ácido. Quando o sal básico é forte (ex.: Tris-hidroximetil aminometano) e o sal ácido é fraco (ex.: ácido bórico), o tampão se torna alcalino, com pH geralmente entre 8,0 a 9,5. Quando o sal ácido é forte (ex.: ácido cítrico) e a base é fraca (ex.: fosfato de sódio dibásico anidro), o tampão se torna ácido, com valores de pH situados entre 5,0 e 6,0. A solução tampão tem concentração específica para cada tipo de eletroforese e é dada pelo grau de sua molaridade (M). Essa concentração molar também é conhecida por “força iônica” do tampão.

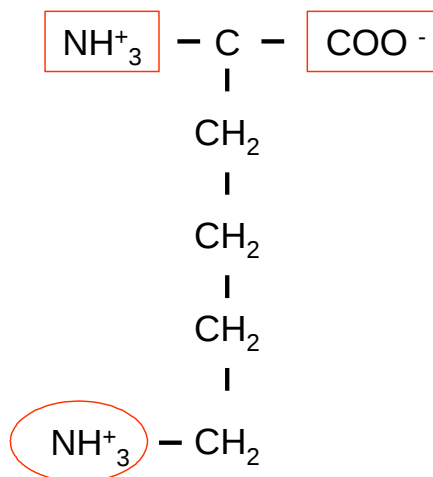
O esquema a seguir é uma representação do conjunto de sistemas que compõem a eletroforese:



A separação de frações (ou fracionamento) de substâncias proteicas ou enzimáticas no sistema eletrofrético somente é possível pelo fato dos aminoácidos que as compõem serem carregados eletricamente. O exemplo a seguir ilustra dois aminoácidos, um com carga negativa excedente (ácido aspártico) e outro com carga positiva excedente (lisina).



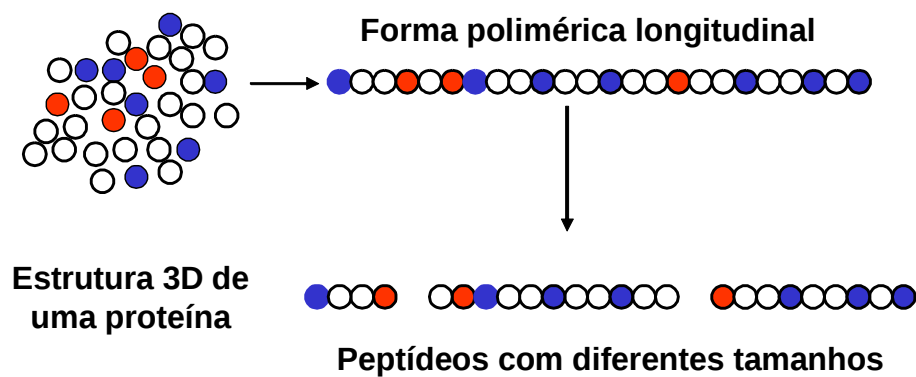
Ácido Aspártico



Lisina

As proteínas, como se sabe, são formações de polímeros constituídos por centenas de aminoácidos, dispostos conforme as

especificidades das sínteses genéticas para cada tipo de proteína ou de enzima. Esses polímeros de aminoácidos interligados podem ser hidrolisados quimicamente em pequenos pedaços de diferentes tamanhos e que são denominados por peptídeos. O exemplo a seguir é a representação de uma proteína hipotética com aminoácidos positivos (•), negativos (•) e neutros (o).



Por essa razão os grupos amino (NH_3^+) e carboxil (COO^-) são reconhecidos como grupos polares devido a sua capacidade de expor suas cargas elétricas. Para ilustrar a importância dos aminoácidos no processo do fracionamento protéico consulte a tabela 2.1.

Tabela 2.1 – Listagem dos aminoácidos de acordo com suas características químicas, físicas e genéticas.

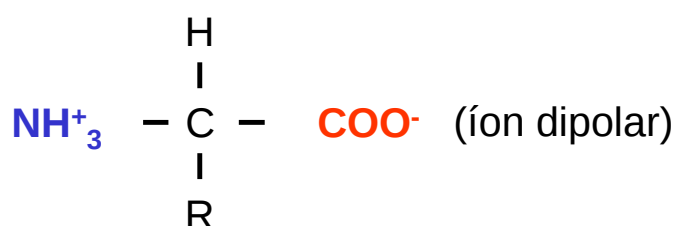
Aminoácido	Bases Nitrogenadas	pI	% nas proteínas
Glicina (1)	GGT-GGC-GGA-GGG	5,9	7,5
Alanina (1)	GCT-GCC-GCA-GCG	6,0	9,0
Valina (1)	GTT-GTC-GTA-GTG	5,9	6,9
Leucina (1)	TTA-TTG-CTT-CTC	5,9	7,5
Isoleucina (1)	ATT-ATC-ATA	6,0	4,6
Prolina (1)	CCT-CCC-CCA-CCG	6,4	4,6
Serina (2)	AGT-AGC	5,6	7,1
Treonina (2)	ACT-ACC-ACA-ACG	5,8	6,0
Cisteína (2)	TGT-TGC	5,0	2,8
Metionina (2)	ATG	5,7	1,7
Asparagina (2)	AAT-AAC	5,4	4,4
Glutamina (2)	CAA-CAG	5,6	3,9
Fenilalanina (3)	TTT-TTC	5,4	3,5
Tirosina (3)	TAT-TAC	5,6	3,5
Triptofano (3)	TGG	5,8	1,1
Ac.Aspartico (4)	GAT-GAC	2,7	5,5
Ac.Glutâmico (4)	GAA-GAG	3,2	6,2
Lisina (5)	AAA-AAG	9,7	7,0
Arginina (5)	AGA-AGG	10,7	4,7
Histidina (5)	CAT-CAC	7,5	2,1

(1) Hidrofóbico não polar; (2) Hidrofílico e polar; (3) Aromático; (4) Ácido; (5) Básico; pI (ponto isoelétrico)

A análise da tabela 2.1 permite concluir que a maioria dos aminoácidos tem pI próximo da neutralidade (entre 5 e 7), mas que ao se juntarem em polímeros protéicos ou enzimáticos tornam essas moléculas geralmente carregadas negativamente. Por essa razão, o sistema eletroforético usado para a maioria das análises é o tipo alcalino.

Em solução tamponada os aminoácidos se comportam como eletrólitos e carregam uma carga positiva (+) ou negativa (-) dependendo do pH da solução tampão usada. Em um meio alcalino (pH maior que 7,0) os aminoácidos se tornam negativamente carregados por se comportarem como um ácido (doam seu íon H^+ ao excesso de OH^- da solução para

formar água). Em uma solução ácida (pH menor que 7,0) os aminoácidos se tornam positivamente carregados, agindo como uma base (aceitam íon H^+ da solução). Por sua vez, em uma solução neutra os aminoácidos adquirem um estado de equilíbrio formando íon dipolar por carregarem cargas negativas e positivas, ao mesmo tempo; a este estado se dá o nome de “zwiterion”, ou íon dipolar:



O ponto isoelétrico (pI) é a denominação que se dá a um estado do aminoácido em que suas cargas positivas e negativas estão em equilíbrio. Um pI baixo, por exemplo, indica que a proteína ou aminoácido, tem mais cargas negativas. Por essa razão a escolha do pH do tampão tem muita relação com o pI da proteína analisada (tabela 2.2).

Tabela 2.2 – Relação entre pI de proteínas e pH de solução tampão.

Tipos de Proteínas	pI	pH do tampão
Albumina	4,9	8,0 a 9,0
Hemoglobina	6,8	8,5 a 9,5
Globulinas	7,0	8,0 a 9,0
Lisozina	11,0	5,0 a 14,0

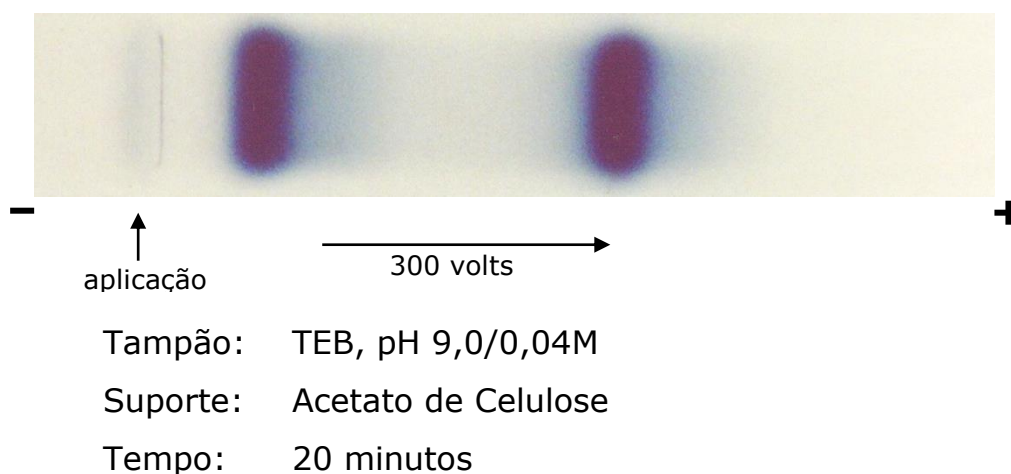
As proteínas são, portanto, estruturas com diferentes graus de complexidade e por essa razão o fracionamento eletroforético não pode ser o mesmo para todas elas. A complexidade protéica pode ser avaliada pela sua disposição especial e que permita agrupa-las em quatro tipos de estruturas: primária, secundária, terciária e quaternária. Por essas razões

há tampões com sais e molaridades específicas para cada tipo de proteína ou de enzima que se pretende fracionar.

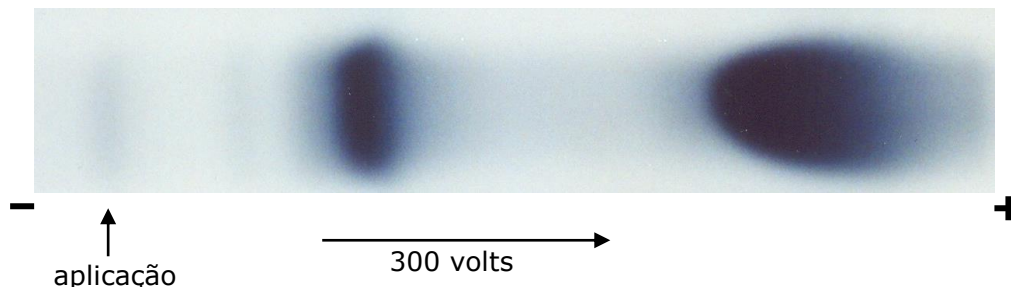
A migração eletroforética

O termo eletroforese é usado para descrever a migração de uma partícula carregada sob a influência de um campo elétrico. Sob condições de corrente elétrica constante, a força de deslocamento de uma partícula é o produto de sua carga efetiva, do potencial de gradiente (molaridade do tampão) e da resistência do meio que é usado como suporte (agar, acetato, gel capilar). Esse conjunto de influências pode ser exemplificado com as hemoglobinas A e C em eletroforese alcalina. Nesse exemplo será usada uma corrente elétrica constante em volts (ex.: 300 volts), com variação da carga efetiva da Hb A e da Hb C que são diferentes (a Hb C tem menos carga negativa que a Hb A). Por outro lado será mostrado o que ocorre com variações na molaridade do tampão usando um mesmo suporte – o acetato de celulose.

1 – Situação Padrão



2 – Situação com variação da molaridade.



Tampão: TEB, pH 9,0/**0,02M**

Suporte: Acetato de Celulose

Tempo: 20 minutos

Comentário: Na situação 1 usou-se os procedimentos padrões e a separação entre as frações de Hb A e Hb C foi de 3 cm. Na situação 2 o tampão TEB foi diluído com diminuição de sua molaridade (0,04 M → 0,02 M). Esse fato permitiu que as frações de Hb A e Hb C se deslocassem com maior velocidade e aumentasse o tamanho da separação entre si para 3,5 cm e ambas ficassem mais espalhadas com perda de qualidade analítica.

Fisicamente, a mobilidade eletroforética ***m*** é definida como a distância ***d*** percorrida num tempo ***t*** por uma partícula sob influência de um potencial de gradiente ***E***, conforme a seguinte fórmula:

$$m = \frac{d}{t E}$$

Desta forma, as distâncias de migrações entre frações podem ser medidas proporcionalmente, para experimentos diferentes, desde que os produtos ***tE*** sejam iguais em todos os casos. Experimentos em que se conservam todas as condições básicas porém com o dobro da voltagem e o tempo de eletroforese reduzido à metade, poderão resultar numa migração com a mesma distância. Entretanto, esta relação é apenas aproximada devido a influência de vários fatores que incluem,

principalmente, o efeito do calor gerado pelo aumento de voltagem. O calor eletroforético é um processo termodinâmico, ou seja, ele ocorre devido à movimentação de moléculas num determinado meio diversificado e que inclui tipos de suporte e tampão, distância entre os eletrodos, miliamperagem e quantidade de amostra aplicada. Se mantivermos constante o tampão, a distância entre os eletrodos, miliamperagem e quantidade de amostra, e variarmos apenas o suporte, o acetato ou gel de agarose a 1%, observaremos que no acetato a geração de calor é menor que no gel de agarose. Esse fato se dá devido à espessura do gel e às malhas microscópicas de proteínas do agar que resultam no efeito de eletroendosmose. O calor intenso pode degradar as proteínas ou enzimas que se pretende fracionar ou, até mesmo, derreter o gel de agarose. Por essas razões a eliminação do calor gerado pela passagem da corrente elétrica no meio de separação (suporte) é um dos maiores problemas em alguns tipos de eletroforese. O resfriamento que se faz em alguns tipos de equipamentos de eletroforese, ou mesmo a sua colocação num refrigerador, resultará na formação de um gradiente de temperatura entre aquelas partes que foram melhor resfriadas e outras que não receberam o mesmo teor de resfriamento. Devido a esta distribuição heterogênea, qualquer gradiente de temperatura, ou diferença de temperatura, causará a distorção nas bandas de moléculas separadas devido às variações nos deslocamentos das frações. Para minimizar estes efeitos, se aconselha o uso de fontes geradoras de energia que tenham o controle não só da voltagem, mas também da miliamperagem. O controle por meio da miliamperagem é mais eficiente para eletroforeses em géis de ágar e poliacrilamida.

Como já foi mencionado antes, se refere a eletroforese como uma técnica que produz movimento de íons através de um suporte estabelecido: gel de agar ou agarose, gel de poliacrilamida, acetato de celulose e eletroforese capilar. A troca iônica entre as partículas analisadas (proteínas ou enzimas) e os grupos eletricamente carregados que compõem o suporte, por exemplo, as malhas protéicas do agar, ou as

partículas do gel de sílica dos capilares, ou as fibras do gel de poliacrilamida, principalmente, gera um movimento elétrico de baixa intensidade em direção oposta ao sentido da eletroforese. Esse movimento elétrico intrínseco é denominado por eletroendosmose.

A eletroendosmose

A eletroendosmose é um fenômeno físico-químico que “atrasa” o desenvolvimento eletroforético e contribui para elevar a intensidade de calor, ou efeito termodinâmico, da eletroforese. O movimento elétrico caracterizado de baixa intensidade tem muita influência no sucesso de um fracionamento eletroforético. A eletroendosmose é desprezível nas eletroforeses em acetato de celulose, porém tem significativa importância quando se usa géis de agar, agarose, sílica e poliacrilamida. A intensidade do efeito eletroendosmótico tem relação direta com a qualidade ou pureza do agar e da sílica utilizada. Quanto mais puro e menos ionizável o gel usado, menor será o efeito eletroendosmótico. O fluxo é definido pela seguinte fórmula:

$$v = \frac{\epsilon \zeta}{4 \pi \eta} E$$

v = velocidade

ϵ = constante elétrica

η = viscosidade do tampão

ζ = zeta potencial

E = voltagem ou miliamperagem (mA)

O efeito eletroendosmótico tem influência do grau de pureza do agar, da sílica ou acrilamida, bem como da espessura dos géis, pois quanto mais espesso o gel, maior será a eletroendosmose. Na sequência

da avaliação deste efeito deve ser considerado a concentração do tampão, ou a sua molaridade. Por fim, o melhor controle do grau da eletroendosmose se faz por meio do consumo elétrico dado pela miliamperagem. Esse controle se faz fixando a miliamperagem, por exemplo, 150 volts/32 mA; se ocorrer a elevação da mA (ex.: 220 volts/50 mA), desde que mantido a concentração do tampão, a eletroendosmose estará se elevando devido ao gel e, assim, a espessura e a qualidade de pureza do agar ou da sílica deverão ser checados.

CAPÍTULO 3: TIPOS DE ELETROFORESES

Acetato de Celulose

O acetato de celulose é um éster produzido pela reação da celulose, extraída e purificada da polpa de madeira, com anidrido acético e ácido acético, na presença catalisadora do ácido sulfúrico. Este produto foi inicialmente usado na fabricação de filmes fotográficos e na indústria têxtil. Por volta dos anos 50 do século passado as indústrias de cigarros passaram a usar o acetato de celulose na confecção de filtros de cigarro devido à sua distribuição homogênea de poros de absorção. No ano de 1958 o pesquisador J. Kohn publicou um artigo que relatava a aplicação da membrana de acetato de celulose como meio de separação e fracionamento de proteínas do soro. Em seu artigo o autor listava várias qualidades da membrana do acetato de celulose para o uso eletroforético, com destaques para:

- a) absorção uniforme das proteínas;
- b) mínimas quantidades de material para serem aplicadas;
- c) características físico-químicas bem definidas e proporcionadas pela homogeneidade dos microporos;
- d) material de relativa pureza e neutralidade química;
- e) possibilidades de transparentização para leitura densitométrica e arquivamento por longo período de tempo.

Por todas essas razões o acetato de celulose passou a ser destinado às análises de proteínas, lipoproteínas, isoenzimas, e hemoglobinas. Além disso, substâncias com baixo peso molecular como os aminoácidos, peptídeos, nucleotídeos, etc. também podem ser fracionadas por eletroforese de acetato de celulose.

Por causa das vantagens listadas acima o uso do acetato de celulose é muito difundido tecnicamente em laboratórios clínicos.

Gel de Ágar ou Agarose

O ágar, também conhecido por ágar-ágar é um hidrocolóide extraído de diversos gêneros e espécies de algas marinhas vermelhas que consiste de uma mistura heterogênea de dois polissacarídeos, a agarose e a agaropectina.

O ágar é insolúvel em água fria, porém expande-se consideravelmente e absorve uma quantidade de água de cerca de vinte vezes o seu próprio peso, formando um gel não-absorvível, não fermentável e atóxico. Possui em sua composição principalmente fibras, sais minerais (P, Fe, K, Cl e I), celulose, anidrogactose e uma pequena quantidade de proteínas. É justamente essa quantidade de proteínas, associada à densidade das fibras formadas pela polimerização das subunidades de galactose, que causam o fenômeno eletroendosmótico ou eletroendosmose. Dessa forma, a utilização do gel de ágar (a agarose) como meio de fracionamento eletroforético de substâncias proteicas e enzimáticas, tem seu sucesso relacionado com o grau de pureza do ágar utilizado para este fim.

A consistência do ágar na forma coloidal por meio do uso de soluções tampões apropriadas é muito firme a partir de concentrações acima de 1%.

A sua operacionalidade é de baixo custo quando se produz o gel de ágar no próprio laboratório. Por outro lado, o custo se eleva consideravelmente se o gel de ágar tem proveniência industrial. Independentemente da origem, o resultado do fracionamento eletroforético em gel de agarose é considerado muito bom.

O gel de ágar pode ser utilizado para análises de rotina laboratorial direcionada ao fracionamento de proteínas, lipoproteínas, enzimas e hemoglobinas, bem como em pesquisas científicas, notadamente em biologia molecular para separação de fragmentos de DNA.

Gel de Poliacrilamida

O gel de poliacrilamida aplicável à eletroforese foi descrito originalmente em 1959 por Raymond e Weintraub com o objetivo de fracionar macromoléculas. Quimicamente, o gel é o produto da polimerização da acrilamida (monômero) e da metilenobisacrilamida, que participa da reação como co-monômero de ligações cruzadas.

A formação do gel ocorre por um mecanismo de polimerização vinílica, com o auxílio de catalizadores. Utiliza-se tradicionalmente a riboflavina (vitamina B₂) como catalizador fotoquímico ou o persulfato de amônio, um catalizador químico. Nos dois casos esses catalizadores participam da geração de radicais livres, contando com a participação de uma amina terciária a N, N, N', N' tetrametilenodiamina (TEMED). Na catálise fotoquímica é necessária a presença de luz e de traços de oxigênio para a formação dos radicais. Na catálise química, ao contrário, o oxigênio funciona como um inibidor. Também é aconselhável, nesse caso, que a polimerização seja realizada ao abrigo da luz.

É importante destacar que a eletroforese em gel de poliacrilamida permite o fracionamento por meio de dois processos, ou seja, a proteína ou enzima é separada por meio da sua carga elétrica (ou ponto isoelétrico) e pelo seu tamanho (ou peso molecular). Para tanto, a preparação do gel de poliacrilamida pode ser individualizada para diferentes faixas de peso moleculares de substâncias a serem submetidas a esse processo. Essa individualidade analítica é determinada por meio da concentração do gel, definida como T (%). Por exemplo, para um gel com T de 5% os poros apresentam um diâmetro médio de 20 nanômetros e que permitem a passagem de proteínas com pesos moleculares entre 150.000 e 200.000 daltons (tabela 3.1).

São inúmeras as variações que se permite fazer usando o gel de poliacrilamida. Por exemplo, ao usar o sistema de tubos ou cilindros é possível preparar um gel com porosidade heterogênea, ou seja, a parte superior do gel com concentração menor (ex.: 7%) e que permite a

passagem de proteínas grandes (PM entre 150.000 e 200.000) através de seus poros, e na parte inferior o gel com concentração maior (ex.: 12%) que permite a passagem de proteínas menores (PM entre 10.000 e 80.000). Esse tipo de gel é conhecido por gel de empilhamento.

Outras variações técnicas incluem o uso de sódio-dodecil-sulfato (SDS), um detergente que desnatura a proteína em seus polipeptídeos formadores. Enfim, por ser uma técnica para múltiplas adaptações, o seu melhor uso é para fins científicos.

Tabela 3.1 – Relação entre a concentração do gel de poliacrilamida e a faixa de pesos moleculares das proteínas a serem separadas.

Concentração do gel (T %)	Faixa de P.M.
3 – 5	> 200.000
5 – 10	150.000 a 200.000
10 – 12	80.000 a 150.000
12 – 15	10.000 a 80.000
> 15	< 10.000

Focalização Isoelétrica

A eletroforese de focalização isoelétrica (EFI) é um método idealizado especificamente para o fracionamento de espécies moleculares (proteínas, enzimas, DNA, peptídeos, etc.) somente por suas cargas elétricas. Dessa forma, esse método permite que cada proteína migre para sua posição correspondente de acordo com o seu ponto isoelétrico, concentrando-se em zonas ou faixas à medida que a espécie molecular analisada alcança essa posição de pH estabelecido.

A EFI se caracteriza pelo uso de um suporte de gel (ágar ou poliacrilamida) que tem em sua composição a adição de substâncias

anfotéricas, ou anfólitos, que se distribuem em faixas de pH graduais dispostas em zonas milimetricamente estabelecidas ao longo do gel entre o ânodo e o cátodo. Essa distribuição organizada por zonas é conhecida por gradiente de pH (figura 3.1).

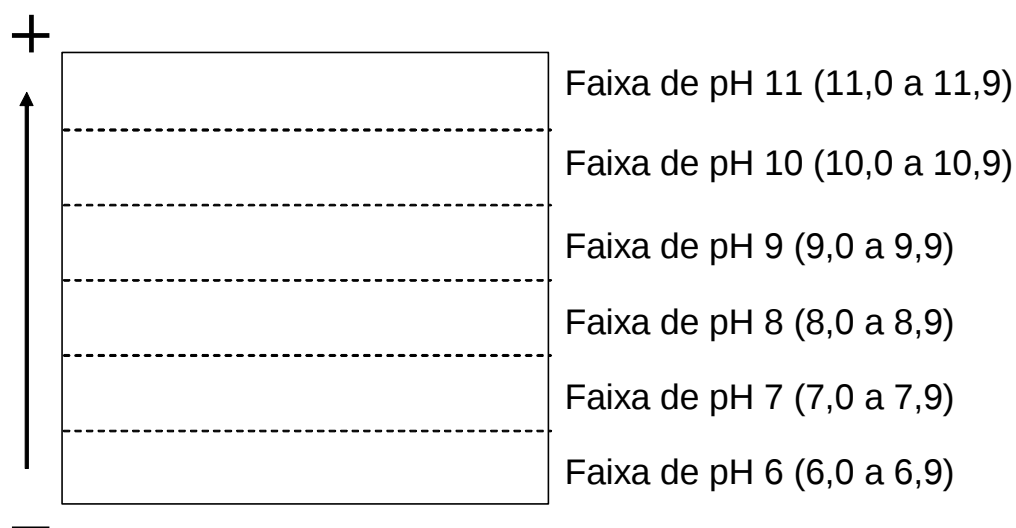


Figura 3.1 - Esquema representativo das faixas de pH 6,0 a 11,0 obtido por meio do uso de substâncias anfotéricas adicionadas ao gel (ágar ou poliacrilamida) que distribuem o gradiente de pH. Uma proteína (ex.: Hb A) que tem seu $pI = 6,8$ se precipita ao alcançar a faixa de pH 6,8.

Quando a EFI foi introduzida, inicialmente destinada a pesquisas científicas e depois adaptada para determinadas rotinas de fracionamento, usava-se a alta voltagem (>500 volts) com excessivo dispêndio de energia devido ao efeito termodinâmico produzido pela eletroendosse. Assim, o suporte eletroforético necessitava de refrigeração para evitar que o gel se derretesse. Atualmente é possível realizar a EFI com voltagem abaixo de 400 volts. A qualidade da separação de frações é superior a qualquer tipo de eletroforese (figura 3.2) porém seu alto custo e necessidade de pessoal especializado para executá-la e interpretá-la, torna seu uso restrito a pesquisas científicas. Atualmente no Brasil a EFI tem importante uso no rastreamento de hemoglobinopatias em sangue de recém-nascidos, cuja análise tem a

curiosa denominação de “teste do pezinho” – devido à obtenção de sangue por punção no pé do recém-nascido. Detalhes técnicos-específicos sobre EFI serão dados no capítulo das técnicas eletroforéticas.

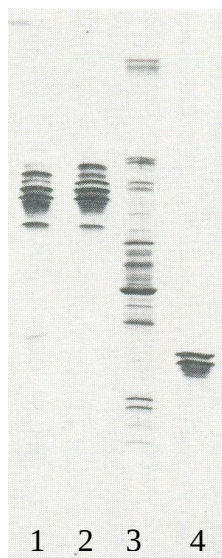


Figura 3.2 - Fracionamento de hemoglobinas AA (1 e 2), CC (4) e L-aminoácido oxidase (3) por EFI de alta resolução. Observe a densidade das frações focalizadas em seus gradientes específicos. Nas hemoglobinas AA é possível visualizar frações rápidas indicativas das hemoglobinas glicadas. Na hemoglobina CC é possível ver uma fração glicada da globina beta C. Os desmembramentos das Hb A e Hb C obtidos nesta figura foram induzidos pelo aquecimento a 50°C, por 60 minutos, das soluções de hemoglobinas diluídas em tampão fosfato M/60, pH 7.4.

Eletroforese Capilar

A eletroforese capilar é um método proveniente do alto nível tecnológico obtido pelos progressos da informática e da pureza de materiais – os tubos capilares. Foi descrita pela primeira vez por Jorgenson e Lukacs em 1981. A busca incessante de materiais de extrema qualidade pelos seus autores permitiu construir tubos com diâmetros internos extremamente pequenos (na faixa de 15 a 100 μ m) com alta

eficiência na separação de frações moleculares e com melhor dissipação de calor.

Na eletroforese capilar é possível empregar diversos modos de separação, cada qual com seu mecanismo e seletividade característicos: eletroforese capilar de zona, isotacoforese capilar, focalização isoelétrica capilar, eletroforese capilar em gel e eletrocromatografia capilar. Entre todos esses tipos específicos a de maior destaque é a eletroforese capilar de zona, inclusive porque é a mais utilizada para o fracionamento de hemoglobinas e proteínas séricas.

Na realidade a eletroforese capilar de zona obteve a preferência entre outros tipos de fracionamento capilar por sua simplicidade e otimização. Basicamente nesse tipo de eletroforese a migração de espécies moleculares ocorre pela combinação dos efeitos dos fluxos eletroendosmóticos e eletroforético que são gerados quando o campo elétrico é aplicado. Na maioria das eletroforeses capilares por zona, o tubo capilar é revestido internamente por gel de sílica e, por essa razão, ocorre o fluxo eletroendosmótico com maior força elétrica que o próprio campo elétrico. Esse fenômeno físico-químico acontece quando, ao passar uma solução do tampão alcalino, formam-se duas camadas elétricas distintas, ou seja, uma camada fixa e compacta dada por meio de cargas negativas da própria constituição do gel de sílica, e outra camada móvel e difusa no sentido catódico (pólo negativo) promovido pelo fluxo eletroendosmótico. Desta forma, cria-se uma diferença de potencial muito próxima da parede do capilar que é conhecida como **potencial zeta**, sendo este potencial dependente da carga da superfície na parede do capilar.

Quando o campo elétrico é aplicado, forças elétricas atuam nas cargas da camada difusa. Com isto, os íons arrastam moléculas de água, formando um fluxo que é direcionado para o cátodo ou pólo negativo, enquanto a parede do capilar permanecer negativa. A magnitude do fluxo eletroendosmótico pode ser expressa em termos de velocidade ou mobilidade segundo as seguintes equações:

$$V_{\text{FEO}} = (\varepsilon \xi / n) E$$

$$M_{\text{FEO}} = \varepsilon \xi / n$$

V: velocidade, M: mobilidade, FEO = fluxo endosmótico, ε : constante dielétrica, ξ = potencial zeta, n: viscosidade, E: potencial elétrico aplicado.

As técnicas disponíveis para eletroforese capilar podem diferenciar conforme o equipamento escolhido. Por essa razão, a introdução da amostra no capilar pode ser feita através de duas técnicas diferentes. Na injeção hidrodinâmica, utiliza-se a aplicação de pressão ou vácuo no sistema, por um determinado período de tempo, fazendo com que uma pequena quantidade de amostra entre no capilar. Na injeção eletrocinética, um campo elétrico é aplicado no frasco da amostra, causando a migração dos componentes da amostra para o interior do capilar.

O fracionamento de espécies moleculares da eletroforese capilar é visualizado por meio de gráfico que expressa com excelente grau de resolução os picos referentes a cada fração separada. Diferentemente da cromatografia, a não existência de fase estacionária diminui o efeito de alargamento, causado pela transferência de massa entre as fases estacionária e móvel. Outro motivo da alta eficiência da separação por eletroforese capilar é que a aplicação de voltagem ao sistema, e não de pressão, evita gradientes de velocidade ao longo da parede do capilar. Desta forma, o fluxo eletroendosmótico é gerado uniformemente ao longo de todo o capilar e migra de forma segmentada, diminuindo o alargamento dos picos.

O sistema de detecção mais usado na eletroforese capilar é o UV-VIS, porém devido ao pequeno caminho óptico do capilar, a principal desvantagem deste tipo de detecção é a sua baixa sensibilidade. Como os equipamentos em geral são equipados com este detector, dependendo do tipo de amostra, é necessário o uso de detectores mais sensíveis, como por exemplo, amperométricos, de condutividade, de fluorescência, ou de espectrometria de massa. As figuras 3.3 e 3.4 mostram esquemas

relativos ao campo elétrico do tubo capilar e o diagrama geral da eletroforese capilar.

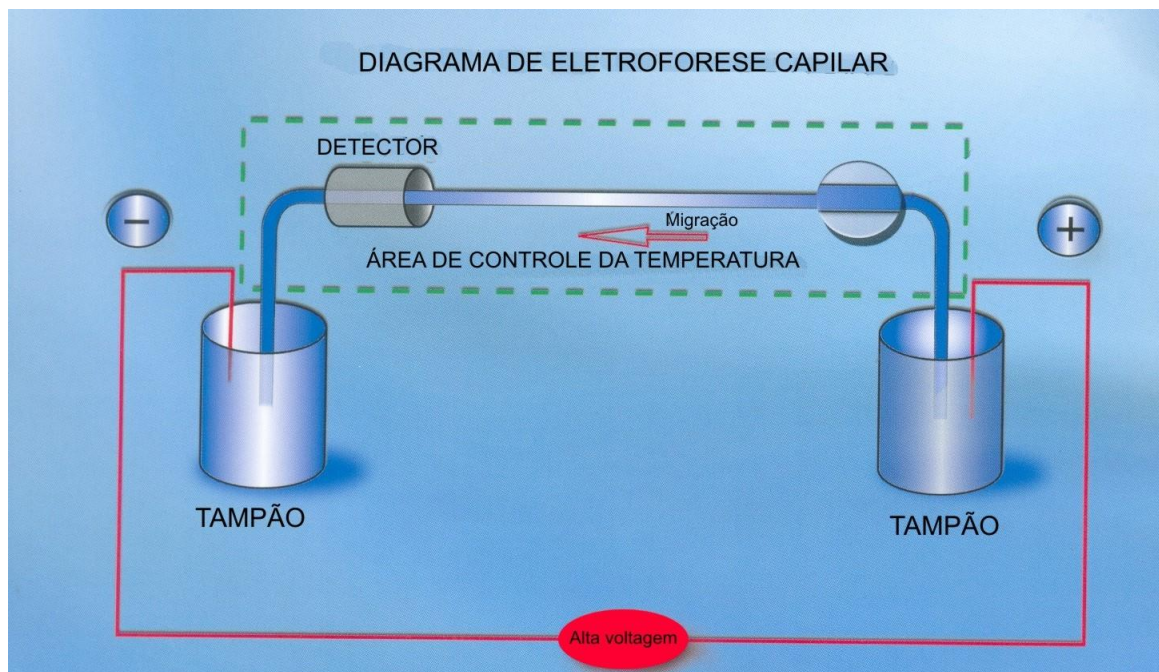


Figura 3.3: Diagrama do campo elétrico da Eletroforese Capilar.

Fonte: SEBIA – CP 8010 Lisses – 91008 EVERY Cedex - France

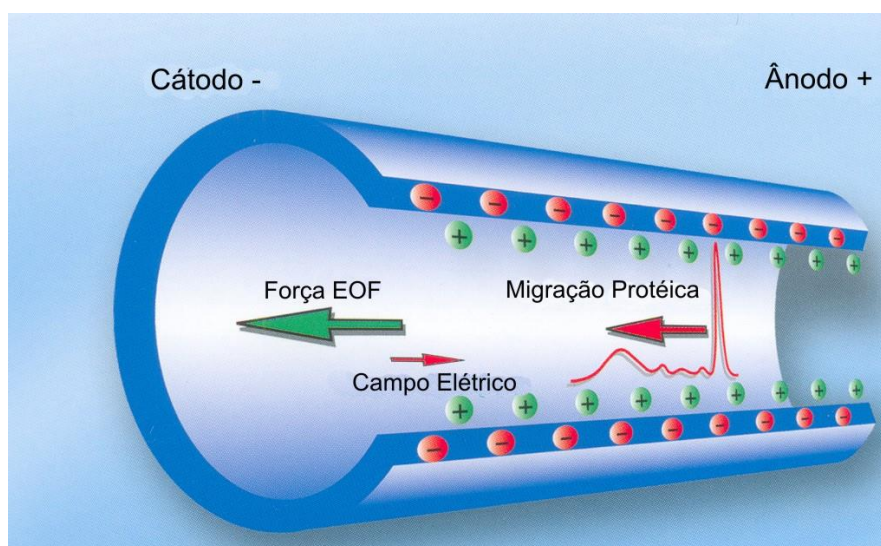


Figura 3.4: Diagrama do tubo capilar com a migração proteica no campo elétrico e a resistência da força EOF (Fluxo Eletro Endosmótico).

Fonte: SEBIA – CP 8010 Lisses – 91008 EVERY Cedex - France

CAPÍTULO 4: REVELAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DAS FRAÇÕES SEPARADAS POR ELETROFORESES

Introdução

Proteínas, lipoproteínas, enzimas e DNA, após terem sido fracionados eletroforéticamente, devem ser revelados para análises. A revelação é geralmente química, enquanto que a quantificação tem por base processos físicos capazes de avaliar as concentrações das diferentes frações. As proteínas com pigmentos corados naturalmente, como são os casos de hemoglobinas e citocromos, podem ser visualizados previamente sem a utilização de corantes, porém, para melhor qualidade analítica, ambas devem ser coradas e descoradas.

Os corantes, em geral, têm alto grau de reação química com o produto que se quer corar (ex.: proteínas, enzimas, etc.) e também com o meio utilizado para o fracionamento (ex.: acetato de celulose, gel de ágar ou agarose e gel de poliacrilamida). Entretanto a fixação do corante é mais intensa com o produto e menos intensa com o meio usado para o fracionamento. Por essa razão, após o procedimento da coloração, que geralmente demora poucos minutos, se usa soluções descorantes necessárias para remover o corante impregnado no meio de separação. Após algumas lavagens com o descorante se sobressaem as frações fortemente fixadas com o corante. Evidentemente essa revelação permite avaliar frações com diferentes intensidades de coloração. A figura 4.1 mostra dois tipos diferentes de corantes usados em eletroforeses de proteínas séricas: (a) coloração com Negro de Amido e (b) coloração com Ponceau. A descoloração para ambos corantes foi feita por meio de seguidas lavagens com solução de ácido acético a 5%. Evidentemente, pelo fato do corante Negro de Amido ser mais impregnante que o corante Ponceau, o número de lavagens para remover o Negro de Amido foi maior em relação ao Ponceau.

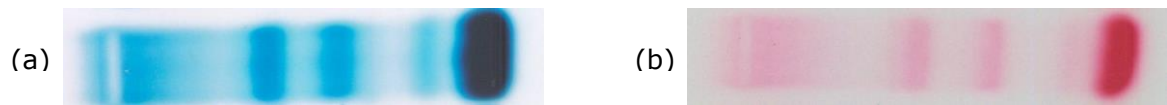


Figura 4.1: (a) Proteínas séricas coradas com Negro de Amido
(b) Proteínas séricas coradas com Ponceau

A escolha do corante ideal é fundamental para o sucesso do fracionamento eletroforético, pois uma boa revelação das frações permite que suas análises qualitativa e quantitativa tenham maior sensibilidade e reprodutibilidade.

Após a revelação das frações é usual que se faça a avaliação qualitativa da eletroforese, observando o desempenho do fracionamento, bem como a verificação de frações com diferentes concentrações e, até mesmo, o aparecimento de frações anormais como as hemoglobinas variantes e gamopatias monoclonais. Em seguida, procede-se a avaliação quantitativa de cada um dos componentes fracionados.

Há duas formas de se avaliar quantitativamente as frações de proteínas, enzimas, lipoproteínas e DNA: eluição e densitometria. A eluição é um método simples que requer uma solução eluidora, por exemplo, o ácido acético a 80%, que desnatura o meio usado no fracionamento (acetato de celulose e gel de ágar, principalmente). As frações assim eluídas tingem a solução eluidora com diferentes intensidades de corante. Por outro lado, a densitometria é uma técnica mais refinada e sensível, com vários tipos de opções de equipamentos, incluindo “softwares” adaptáveis a “scanners” de computadores.

Coloração e Descoloração

Para corar proteínas, enzimas, lipoproteínas e DNA utiliza-se de corantes específicos. Para proteínas, por exemplo, pode ser usado um

dos seguintes corantes: Negro de Amido, Ponceau e Azul de Bromofenol. As características químicas desses corantes permitem que os mesmos se liguem ao último aminoácido das proteínas, fixando-se nelas e corando-as com intensidades proporcionais às suas respectivas concentrações.

As enzimas, por sua vez, necessitam de substratos enzimáticos específicos, tampões com pH ajustados, aquecimentos variáveis e diferentes tipos de luz para que sejam reveladas.

Para a coloração de lipoproteínas é comum o emprego de corantes que apresentam afinidade por gordura neutra, fosfolípidos, esteróis e outros tipos de lípidos. Dois corantes são frequentemente usados para identificar as frações de lipoproteínas: o Sudan Black e o Fat Red. O corante Sudan Black se aplica principalmente para o acetato de celulose, enquanto que o Fat Red é muito usado para eletroforeses em gel de ágar ou agarose. Em laboratórios de análises clínicas a preferência é pelo corante Fat Red devido ao fato de ser menos impregnante e com maior facilidade de descoloração.

O fracionamento de bandas de DNA fragmentado pode ser visualizado por diversos tipos de revelação, com destaques para o Brometo de Etídio, Nitrato de Prata e Azul de Metileno. Da mesma forma, a descoloração é variável conforme o tipo de corante usado.

Eluição

A quantidade das proteínas eluídas se faz determinando-a fotometricamente, em determinados comprimentos de onda. A maior parte dos diferentes tipos de proteínas, além dos lípidos e das enzimas, são eluídos e quantificados após prévia coloração de suas frações. Por outro lado, a hemoglobina por ser um pigmento naturalmente corado não necessita ser submetido a corantes.

Para calcular as concentrações das frações separadas por eletroforese deve-se determinar a quantidade relativa de cada fração

corada (natural ou quimicamente). A forma mais simples e correta é cortar o acetato de celulose em segmentos correspondentes a cada fração e medir as densidades ópticas dos eluatos em um espectrofotômetro com comprimento de onda adequado. Desde que as eluições de todas as frações tenham sido completas e uniformes, e as soluções obtidas obedeçam à lei de Beer, a porcentagem de cada fração se calcula da seguinte forma:

$$\% F = \frac{D.O. \times V \quad \times 100}{\Sigma (D.O. \times V.) \text{ de todas as frações}}$$

onde, V é o volume da solução usada para eluição, e F é o correspondente a cada fração analisada.

Densitometria

A densitometria permite a determinação quantitativa rápida das frações separadas por eletroforese, sendo amplamente usada em laboratórios clínicos.

O densitômetro é basicamente um colorímetro modificado, que mede a absorção da luz que atravessa as frações coradas no suporte utilizado (acetato de celulose, agarose, papel).

As quantidades relativas de corante, absorvido por fração separada, podem ser determinadas somando as áreas compreendidas pelo traçado específico de cada proteína. Este tipo de determinação pressupõe uma relação linear entre as densidades ópticas e a concentração do corante no suporte usado para destacar as bandas fracionadas. Atualmente todo este processo é realizado por meio de programas de computador integrados ao equipamento de densitometria, ou até mesmo ao equipamento automatizado para eletroforeses.

CAPÍTULO 5: HEMOGLOBINAS NORMAIS

A Molécula

A molécula de hemoglobina é estruturalmente composta por duas globinas do tipo alfa e duas do tipo beta, compondo um tetrâmero com formato globular (figura 5.1).

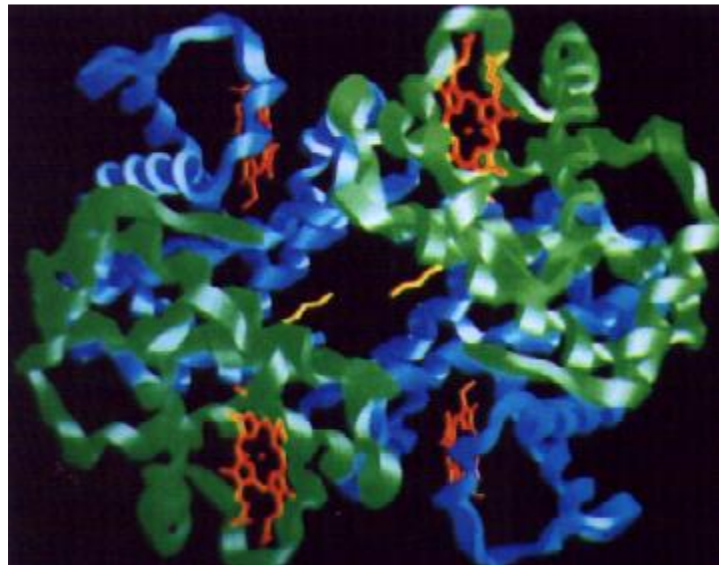


Figura – 5.1 – Modelo espacial do tetrâmero da molécula de hemoglobina formado por duas globinas do tipo alfa e duas do tipo beta, com o grupo heme inserido em cada uma das globinas.

As dimensões espaciais do tetrâmero são as mesmas nas hemoglobinas embrionárias (Gower-1, Gower-2 e Portland) e nas hemoglobinas Fetal, A e A₂, com diâmetro de aproximadamente 5,5 nanômetros configurando-lhes um modelo globular e discretamente achatado. A tabela 5.1 mostra a composição estrutural básica dessas hemoglobinas e suas concentrações específicas nas diferentes fases do desenvolvimento humano.

Tabela 5.1 – Relação entre os diferentes tipos de hemoglobinas, composições estruturais e concentrações, com as fases de desenvolvimento ontogênico.

Fase da ontogênese	Hemoglobina	Estrutura	Concentração (%)
Embrionária	Gower – 1	$\zeta_2 \epsilon_2$	20 – 40
	Portland	$\zeta_2 \gamma_2$	5 – 20
	Gower – 2	$\alpha_2 \epsilon_2$	10 – 20
Fetal (*)	Fetal	$\alpha_2 \gamma_2$	90 – 100
Pós Nascimento	A	$\alpha_2 \beta_2$	96 – 98
	A ₂	$\alpha_2 \delta_2$	2 – 4
	Fetal	$\alpha_2 \gamma_2$	0 – 1

(*) Na fase fetal ocorre o início da síntese da Hb A, não excedendo 10% de concentração.

O peso molecular das hemoglobinas humanas é próximo de 64.500 daltons, com pequenas variações entre os diferentes tipos. Todas as moléculas de hemoglobinas das fases embrionária, fetal e pós-nascimento têm 574 aminoácidos, dos quais 282 estão na composição das duas globinas tipo alfa (141 aminoácidos por globina tipo alfa) e 292 na composição das duas globinas tipo beta (146 aminoácidos por globina tipo beta). Os graus de semelhanças estruturais, calculado com base na similaridade da composição de aminoácidos entre os tipos de globina são variáveis com maior identidade entre as globinas beta e delta (96% de semelhança), seguida da beta e gama (71%), e com menores similitudes entre alfa e beta (42%), e alfa e gama (39%).

A estabilidade das moléculas de hemoglobinas, quer sejam embrionárias, Fetal, A ou A₂, é dependente do arranjo estrutural que ocorre entre a composição das globinas do tipo alfa com as do tipo beta. As estruturas tridimensionais desses dois grupos de globinas são muito parecidas, apesar de suas seqüências de aminoácidos serem diferentes, conforme apresentado acima. A conformação globular da molécula de hemoglobina se deve à extensa disposição helicoidal dos polipeptídeos que compõem as globinas dos tipos alfa e beta (figura 5.2), que representa 75% do total da sua estrutura. Os trabalhos realizados por **Perutz** e **Kendrew** em 1959 utilizando o método de cristalografia de proteínas por meio da difração de raio-X, mostraram algumas particularidades físico-químicas da molécula de hemoglobina definitiva ou adulta (Hb A). A Hb A possui um rearranjo tetraédrico devido a conformação pareada de duas globinas alfa (α_2) e duas beta (β_2). Essa disposição tetramérica $\alpha_2 \beta_2$ somente é possível devido às ligações físico-químicas de diferentes intensidades que possibilitam a movimentação da molécula durante a oxigenação. Para tornar mais fácil o entendimento dessas ligações e das suas relações com a fisiologia da hemoglobina, denominou-se o tetrâmero químico $\alpha_2 \beta_2$ em $\alpha^1 \alpha^2 / \beta^1 \beta^2$ (figura 5.2), devido aos contatos intermoleculares que ocorrem entre globinas alfa e beta.

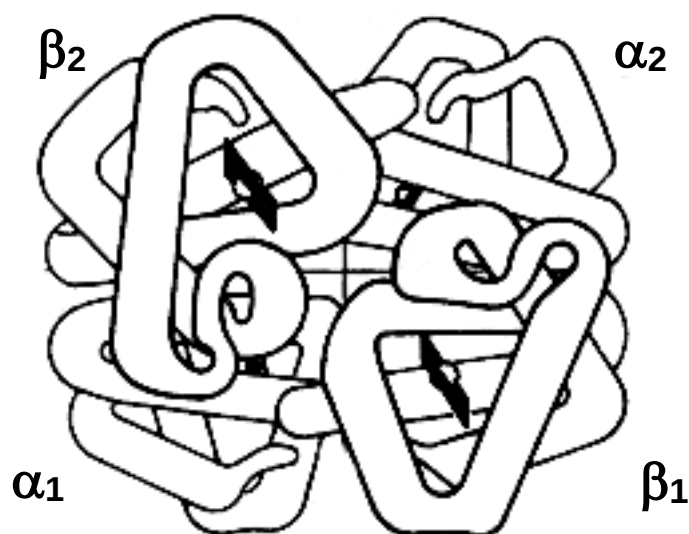


Figura 5.2 – Contatos intermoleculares entre as globinas alfa e beta. Os contatos $\alpha_1 \beta_1$ e $\alpha_2 \beta_2$ têm importância na estabilidade da molécula. Os contatos $\alpha_1 \beta_2$ e $\alpha_2 \beta_1$ atuam na movimentação da molécula durante a oxigenação.

Pela disposição do tetrâmero da hemoglobina observa-se que as globinas alfa e beta se situam diagonalmente, de tal forma que os contatos entre os aminoácidos da globina α^1 com a globina β^2 ($\alpha^1 \beta^2$) são iguais aos que ocorrem entre as globinas $\alpha^2 \beta^1$. Da mesma forma os contatos intermoleculares entre $\alpha^1 \beta^1$ são iguais aos $\alpha^2 \beta^2$. Os contatos entre as globinas $\alpha^1 \beta^2$ e $\alpha^2 \beta^1$ envolvem um total de 38 aminoácidos (6,6% do total de aminoácidos da molécula). Esses contatos $\alpha^1 \beta^2$ e $\alpha^2 \beta^1$, que se dispõem na vertical do modelo molecular da figura 5.2, promovem movimentos de deslizamento das globinas alfa e beta, fato que facilita a oxigenação dos quatro grupos heme da molécula. Os contatos intermoleculares entre as globinas $\alpha^1 \beta^1$ e $\alpha^2 \beta^2$ são mais extensos pois participam 68 aminoácidos (11,8% do total de aminoácidos da molécula) que se dispõem na horizontal do modelo molecular da figura 5.2. Esses contatos $\alpha^1 \beta^1$ e $\alpha^2 \beta^2$ são os que mantêm a integridade físico-química do tetrâmero, dando-lhe estabilidade molecular. Os contatos $\alpha^1 \alpha^2$ ocorrem

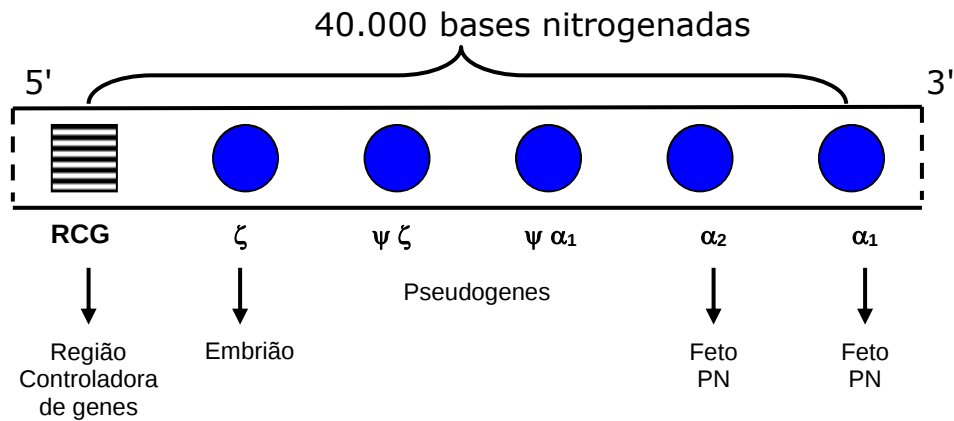
somente na forma desoxigenada da hemoglobina, e tem influência na interação entre os grupos heme, no efeito Bohr e no transporte de CO₂. Os contatos $\beta^1 \beta^2$ ocorrem nas formas oxi e desoxigenadas, e são responsáveis pela acomodação da molécula de 2,3 difosfoglicerato (2,3 DPG) durante a desoxigenação da hemoglobina.

Os estudos seqüentes sobre a configuração estrutural da molécula de hemoglobina demonstraram que as globinas dos tipos alfa e beta tem duas regiões específicas, a interna e a externa. As regiões internas são compostas por aminoácidos não-polares e hidrofóbicos localizados em 75% da molécula, incluindo os helicóides e o grupo de aminoácidos que envolvem o grupo heme. As regiões externas são bem menos extensas, pois compreendem apenas 25% do conteúdo molecular, e são formadas por aminoácidos polares e hidrofílicos que se dispõem nas partes não helicoidais da molécula, fazendo contato com a água (ver tabela 2.1).

Síntese Genética

A síntese das globinas requer um rígido controle genético do DNA inserido sequencialmente no agrupamento de genes de globina tipo alfa (RCG – ζ – $\psi\zeta$ – $\psi\alpha_1$ – α_2 – α_1) no braço curto do cromossomo 16, e do DNA que faz parte do agrupamento de genes de globina do tipo beta (RCG – ε – γ^G – γ^A – $\psi\beta$ – δ – β), conforme mostra a figura 5.3.

CROMOSSOMO 16 – GENES DO TIPO ALFA



CROMOSSOMO 11 – GENES DO TIPO BETA

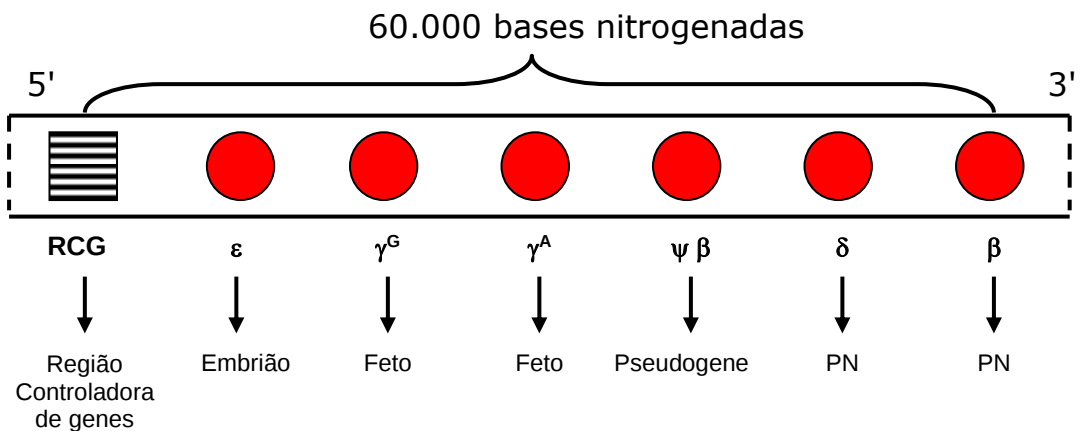


Figura 5.3 – Esquema representativo do agrupamento de genes de globinas do tipo alfa (cromossomo 16) e tipo beta (cromossomo 11), com destaques para a Região Controladora de Genes (RCG) e o tamanho de cada agrupamento caracterizado pelo número aproximado de bases nitrogenadas. PN: pós-nascimento.

Ao analisar os genes do tipo alfa no cromossomo 16 e os do tipo beta no cromossomo 11 é possível observar que há uma sequência lógica em ambos, iniciando com um gene conhecido por **RCG** que é o gene controlador de todos os outros genes dos agrupamentos alfa ou beta. A sigla RCG significa “região controladora de genes”. A seguir, em ambos agrupamentos, há os genes embrionários (ζ no cromossomo 16 e ϵ no cromossomo 11), os genes fetal (γ^G e γ^A) e os genes pós-nascimento (PN) α_2 e α_1 no cromossomo 16, e β e δ no cromossomo 11.

É do gene RCG que saem moléculas de RNA polimerases específicas para cada gene do agrupamento de genes do tipo alfa ou do tipo beta. Essas moléculas de RNA polimerases fazem com que o DNA de cada gene se duplique e uma dessas cópias dê origem ao RNA mensageiro específico para a síntese de globina alfa, beta, gama ou delta, por exemplo. É importante ressaltar que todo esse processo ocorre nos eritroblastos, principalmente nos policromáticos e ortocromáticos, na medula óssea. As sínteses de globinas alfa e beta são simultâneas, bem como a do grupo heme.

As Hemoglobinas Normais

A síntese de moléculas de hemoglobinas abrange a ação de genes de globinas α , β , δ e γ , além dos genes da fase embrionária (ζ e ϵ), conforme mostra a figura 5.3. Durante esse processo biológico que é desenvolvido nos eritroblastos e reticulócitos, destacam-se duas organelas: ribossomos e mitocôndrias. Nos ribossomos as bases nitrogenadas são traduzidas em seus respectivos aminoácidos (ver tabela 2.1 do capítulo 2) e interligadas entre si para formarem moléculas de globinas. Nas mitocôndrias se formam os grupos heme.

Como resultado dessas ações biológicas as sínteses de globinas α , β , γ e δ ocorrem concomitantemente com os grupos heme que se inserem na estrutura terciária dessas globinas e, em seguida, se

dimerizam em α_2 , β_2 , δ_2 e γ_2 , para então se tetramizarem em moléculas de estrutura quaternária de $\alpha_2\beta_2$ (Hb A), $\alpha_2\delta_2$ (Hb A₂) e $\alpha_2\gamma_2$ (Hb Fetal). Essa síntese de hemoglobinas descrita para a fase pós-nascimento, que será efetiva para toda a vida do indivíduo, acontece também nas fases fetal e embrionária. Entretanto, para o fim de expor didaticamente o equilíbrio que se verifica entre as globinas dimerizadas alfa e não-alfa (β , δ , γ), representamos por meio de figuração hipotética a formação de hemoglobinas A, A₂ e Fetal após o sexto mês de vida (figura 5.4)

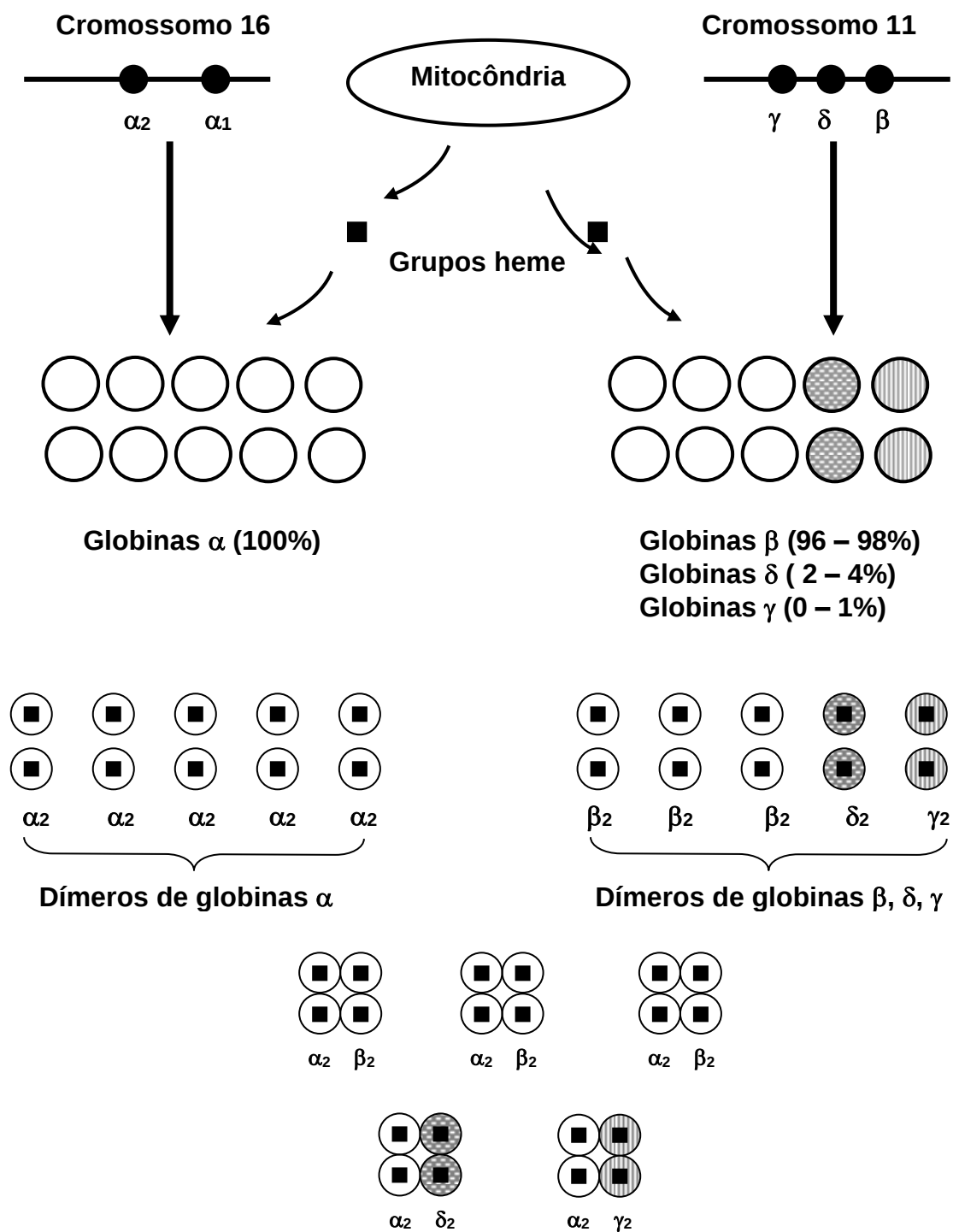
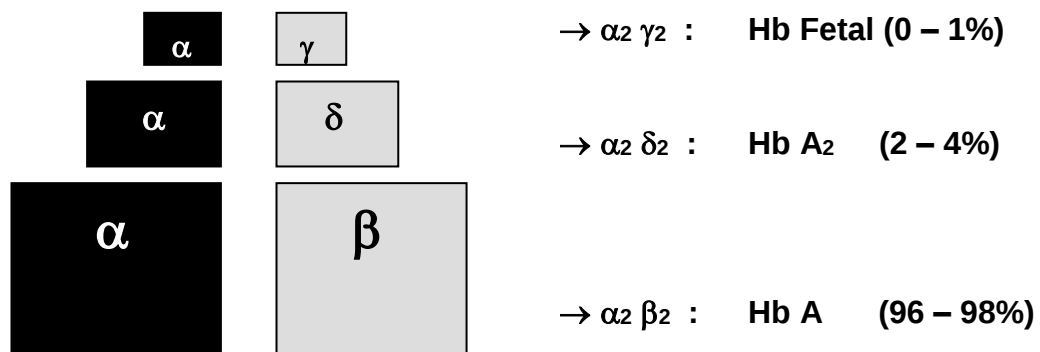


Figura 5.4 – Esquematização hipotética da formação equilibrada entre globinas alfa e não-alfa (β , δ e γ) após o sexto mês de vida.

Se pudéssemos “encaixotar” as globinas alfa e não-alfa seria possível construir modelos representativos do equilíbrio das globinas alfa e não-alfa (β , δ , γ) das hemoglobinas normais e também do desequilíbrio que se ocorre nas talassemias alfa e beta (figura 5.5).



Equilíbrio entre Globinas nas Hemoglobinas Normais

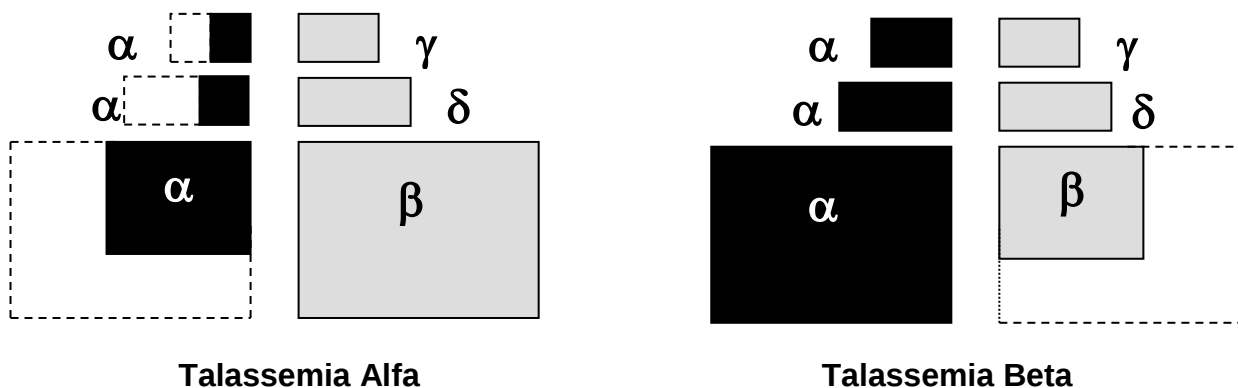


Figura 5.5 – Esquematização do equilíbrio entre globinas na formação de hemoglobinas normais, e dos desequilíbrios na talassemia alfa (diminuição da síntese de globina α) e na talassemia beta (diminuição da síntese de globina β).

Considerando que o volume de síntese das hemoglobinas A, A₂ e Fetal é proporcional às suas respectivas concentrações obtidas por

fracionamento eletroforético ou cromatográfico, é também possível supor que em condições normais essas três hemoglobinas compartilham do mesmo espaço – obviamente com concentrações diferentes – dentro de um mesmo eritrócito. Consideram-se, portanto como hemoglobinas normais as três frações identificadas por Hb A, Hb A₂ e Hb Fetal em pessoas com idade superior a 6 meses, conforme mostra a figura 5.6 obtida por eletroforese de hemoglobina em agarose alcalina (pH 8,5).

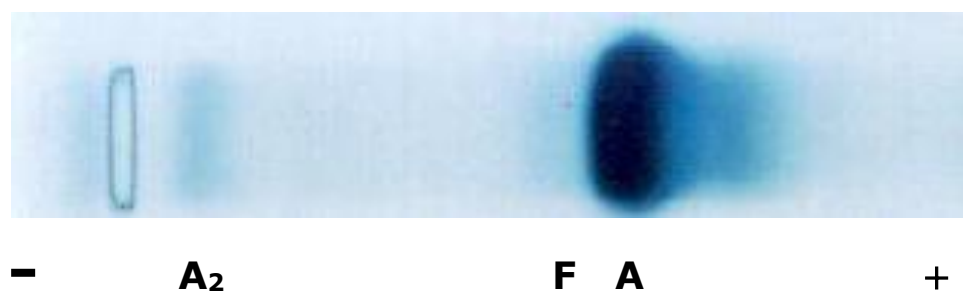


Figura 5.6 – Eletroforese de hemoglobina.

Algumas características sobre essas três hemoglobinas normais devem ser ressaltadas.

A Hb A por ser a molécula mais representativa e, portanto, evolutivamente a mais capacitada para as funções básicas, por exemplo: troca gasosa e participação na manutenção do equilíbrio ácido-básico, é considerada como padrão físico-químico, genético e molecular. Assim, todos os outros tipos de hemoglobinas normais (embrionárias e fetal) e variantes (Hb S, Hb C, Hb Instáveis, Hb com alterações fisiológicas, etc.) têm suas estruturas moleculares, atividades físico-químicas e genéticas, comparadas com as da Hb A.

A Hb A₂ é considerada como a hemoglobina mais estável sob o ponto de vista de estrutura molecular. Sua concentração padrão (2 a 4%) tem importância no teste de identificação de talassemia beta menor, pois em 95% das pessoas portadoras desse tipo de talassemia a

Hb A₂ apresenta-se com concentração elevada (>4,0% - 7,0%). Por outro lado, a diminuição da Hb A₂ abaixo de 2% de sua concentração é indicativo de anemia ferropriva ou de talassemia alfa menor (Hb AH).

A Hb Fetal é fisicamente menos estável que a Hb A. A elevação de Hb Fetal acima de 1,0% em pessoas com idade superior a 6 meses é indicativo de talassemia beta menor (Hb Fetal: > 1,0% - 5,0%, associada a anemia microcítica e hipocrômica de discreto grau) ou de persistência hereditária de Hb Fetal (Hb Fetal: > 1,0% - 20,0%, geralmente com eritrograma normal) ou, também, de talassemia beta maior (Hb Fetal acima de 20%, associada a anemia microcítica e hipocrômica de grave intensidade).

Por todas essas razões justifica-se sempre no estudo das hemoglobinas a avaliação quantitativa das hemoglobinas A, A₂ e Fetal.

Por fim, ao se referir que uma pessoa é portadora de hemoglobinas normais usa-se a representação **Hb AA** que indica que o indivíduo recebeu do pai e da mãe os genes $\alpha^A\beta^A$.

Hemoglobinas Embrionárias

As hemoglobinas embrionárias têm interesse apenas científico, porém é sempre importante considerá-las no sentido de entender o processo da sua evolução e diferenciação genética e fisiológica.

Até o presente se conhece três tipos de hemoglobinas embrionárias (Portland, Gower-1 e Gower-2) que podem ser visualizadas por meio de eletroforese alcalina (figura 5.7).

Sob o ponto de vista fisiológico as hemoglobinas Gower-1 e Gower-2 apresentam baixa afinidade ao oxigênio, fato que permite rápida liberação de oxigênio na fase inicial do embrião. A outra hemoglobina embrionária, Hb Portland, pelo fato de ter a globina gama em sua composição, apresenta-se com alta afinidade ao oxigênio, e sua presença é mais representativa na transição entre o embrião e o feto. Ao se

transformar em feto, a hemoglobina predominante é a Hb Fetal que tem alta afinidade ao oxigênio e é a causa da elevada concentração de hemoglobina em sangue de neonatos. As sínteses das hemoglobinas embrionária e fetal se caracterizam como os melhores exemplos de regulação genética, com atuação de RNA polimerases específicas e que se “desligam” à medida que o embrião se desenvolve, se transforma em feto e quando ocorre o nascimento.

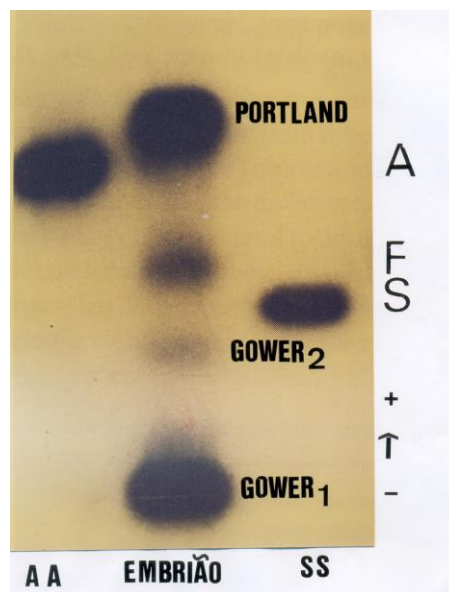


Figura 5.7 – Eletroforese de hemoglobinas em acetato de celulose – pH 8,6. Comparação entre hemolisado com hemoglobinas de um embrião, da Hb A de uma pessoa sem hemoglobinopatias e da Hb S (SS) de uma pessoa com anemia falciforme. Observar que no embrião as hemoglobinas Portland e Gower-1 são as mais concentradas, seguida da Hb Fetal e Gower-2.

Hemoglobinas Glicosiladas

Após o nascimento, observa-se que além das hemoglobinas A, A₂ e Fetal, surgem outros cinco tipos de moléculas que constituem o grupo das hemoglobinas glicosiladas: Hb A_{1a-1}, Hb A_{1a-2}, Hb A_{1b}, Hb A_{1c} e Hb A_{1d}. O conjunto dessas hemoglobinas que eletroforeticamente se posicionam um pouco à frente da Hb A, sem que ocorra um fracionamento visível (figura 5.8), representa 5 a 8% da concentração da Hb A. Todas essas hemoglobinas são derivadas da Hb A por terem hexoses ligadas à região N-terminal do primeiro aminoácido da globina beta – a valina. A glicosilação ocorre por um processo lento com intermediação enzimática durante a hemoglobinogênese. Assim, as hexoses permanecem ligadas à Hb A por todo o tempo de vida do eritrócito, que é de 120 dias, em média. A Hb A_{1c} por apresentar maior concentração entre as hemoglobinas glicosiladas, atua como sensível marcadora biológica da glicose sangüínea. A tabela 5.2 relaciona, suas concentrações e os produtos específicos de glicosilação.

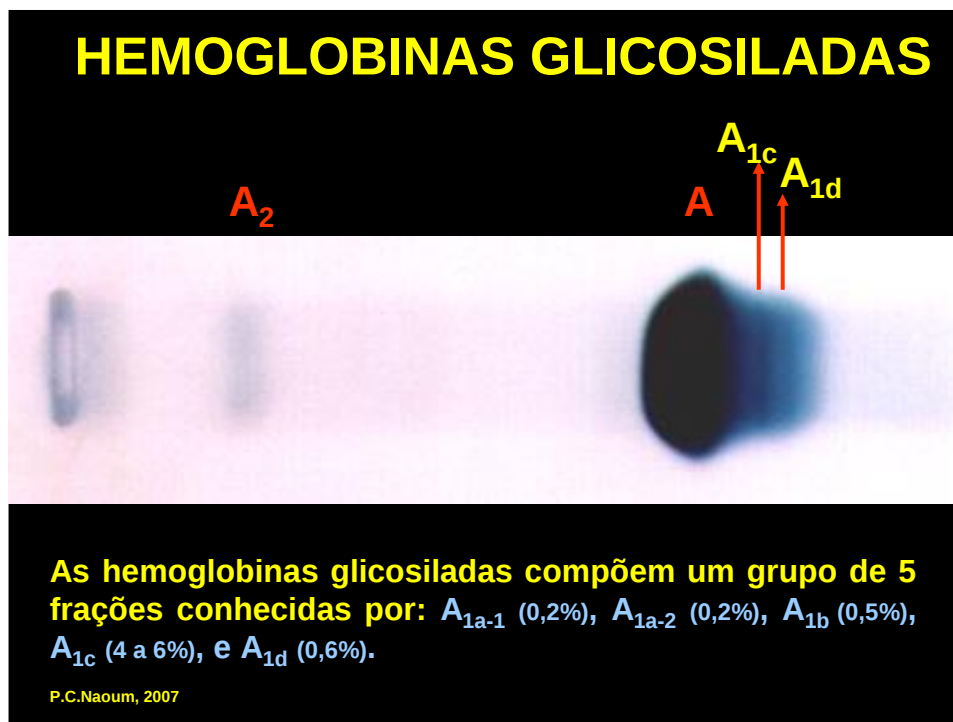


Figura 5.8 – Eletroforese de hemoglobinas em acetato de celulose, tampão alcalino (TEB pH 8,6) mostrando à frente da Hb A as frações de hemoglobinas glicosiladas, com destaques para A_{1c} e A_{1d} .

Tabela 5.2 – Subtipos de HbA₁ relacionados com suas concentrações e glicolização.

Subtipo	Concentração (%)	Glicolização
A1a – 1	0,2	Hexose – difosfato Frutose – difosfato Glicose, manose e galactose difosfato
A1a – 2	0,2	Hexose – monofosfato Glicose – 6 – fosfato Glicose, manose e galactose monofosfato
A1b	0,5	Hexose não – fosforilada Glicose, manose, galactose
A1c	4 – 6	1 – deoxi – beta – D – frutose
A1d	0,4	Beta – D – glicopiranosil

CAPÍTULO 6: HEMOGLOBINOPATIAS

Introdução

As alterações das hemoglobinas envolvem a síntese estrutural e quantitativa dos aminoácidos que compõem as diferentes cadeias de globinas, bem como as moléculas e enzimas que participam da formação do grupo heme.

As alterações que ocorrem nas globinas se devem às modificações nos genes responsáveis pelo sequenciamento e estrutura de cada tipo de polipeptídeo de globina, bem como naqueles destinados à regulação quantitativa da síntese equilibrada entre as globinas alfa e beta (β , δ e γ). Quando um determinado gene apresenta uma de suas bases nitrogenadas substituída por outra diferente, resulta na formação de moléculas de hemoglobinas com características bioquímicas alteradas em relação às hemoglobinas normais e são por isso denominadas **hemoglobinas variantes**. Por exemplo, a hemoglobina S se deve à introdução do aminoácido valina (Val) no lugar do ácido glutâmico (Glu) na posição número 6 da cadeia polipeptídica da globina beta por meio de um processo conhecido por mutação. Essa anormalidade se deve a uma troca da base nitrogenada adenina (A) pela timina (T), conforme a sequência representada a seguir:

Aminoácidos	5	6	7
Bases nitrogenadas da globina β A	CCT —	GAG —	GAG
Aminoácidos da globina β A	Pro	Glu	Glu
Bases nitrogenadas da globina β S	CCT —	GTG —	GAG
Aminoácidos da globina β S	Pro	Val	Glu

As mutações que afetam o controle dos genes para as sínteses equilibradas entre as globinas alfa e não-alfa são muito

diversificadas. Em geral, essas mutações provocam diminuições no volume de síntese de uma das globinas com intensidades variáveis, ou até mesmo ausência de síntese. Nesses casos ocorrem desequilíbrios do conteúdo entre a globina produzida normalmente e a alterada. Quando a mutação bloqueadora de síntese de globina atinge, por exemplo, o gene alfa (talassemia alfa), há diminuição do conteúdo de globina alfa dentro das células eritróides, enquanto a síntese de globina beta se faz normalmente. Essa diferença de síntese entre globinas alfa e beta promove o desequilíbrio entre elas, e as consequências fisiopatológicas são proporcionais ao tamanho do desbalanceamento ocorrido (figura 6.1).

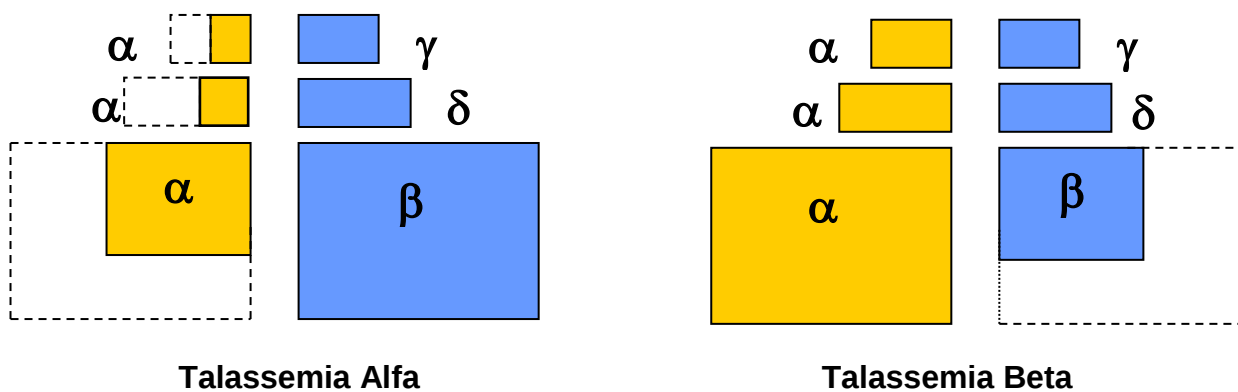


Figura 6.1 – Esquematização do equilíbrio entre globinas na formação de hemoglobinas normais, e dos desequilíbrios na talassemia alfa (diminuição da síntese de globina α) e na talassemia beta (diminuição da síntese de globina β).

Dessa forma, conceitualmente se denominam **hemoglobinas variantes** aquelas que apresentam estrutura química diferente à da sua hemoglobina normal correspondente (A, A₂ ou Fetal), motivada pela mutação de uma ou mais bases nitrogenadas que resultam na substituição de um ou mais aminoácidos nas globinas alfa, beta, delta ou gama. As **hemoglobinas anormais** são aquelas consideradas variantes, bem como as hemoglobinas normais com alterações quantitativas, por

exemplo: Hb A₂ elevada, Hb Fetal elevada, Hb A₂ diminuída. As **talassemias** consistem em um conjunto de síndromes motivadas principalmente por alterações de sínteses quantitativas de globinas alfa e beta, causando desequilíbrio entre elas e variáveis graus de anemias hemolíticas, além de várias outras conseqüências patológicas. As **hemoglobinopatias** são designações destinadas às hemoglobinas variantes que causam anemia hemolítica, policitemia, cianose ou falcização.

Finalmente, há as hemoglobinas anormais e hemoglobinopatias **não-hereditárias**, que representam um grupo restrito de alterações das hemoglobinas normais causadas por agentes indutores e são também conhecidas como formas adquiridas. Entre as hemoglobinas anormais não-hereditárias destacam-se a Hb A₂ diminuída nas ferropenias, a Hb A₂ aumentada na malária, no diabetes e na doença de Chagas; a Hb Fetal elevada em certas doenças mielóides, em transplantados renais, em portadores de HIV ou por uso de determinadas drogas, e a Hb H adquirida nas doenças linfó e mieloproliferativas. Por outro lado, as hemoglobinopatias não-hereditárias mais comuns são as metaemoglobinas elevadas por indução de drogas oxidantes (sulfa e derivados, nitritos, anilina etc.), gases e solventes oxidantes.

As Hemoglobinas Variantes

A maioria das variantes estruturais é originada por simples substituições de aminoácidos, resultantes de mudanças nas seqüências de nucleotídeos. As alterações estruturais, com conseqüências nas atividades físico-químicas da molécula, estão na dependência da extensão do processo mutacional e dos locais em que esses ocorrem. Dessa forma, as hemoglobinas variantes podem originar-se por:

- a) Substituição de um aminoácido por outro, de características diferentes, na **superfície externa** (figura

6.2) da molécula. Pode ocorrer também a substituição de dois aminoácidos por outros dois, em uma mesma cadeia, sendo, entretanto, condição muito rara. As substituições de aminoácidos na superfície externa, com exceção feita às Hb S, Hb C e Hb E, não produzem alterações significantes no funcionamento da molécula. Nesse grupo estão cerca de 500 tipos de Hb variantes não patológicas (ex.: Hb O, Hb J, Hb I, Hb N, Hb D, etc.). Substituições de aminoácidos na **superfície interna** da molécula, envolvendo resíduos polares e não-polares, têm ocorrido preferencialmente nos locais invariantes da molécula, incluindo aqueles que fazem parte do "pacote" do grupo heme, cuja principal função é protegê-lo da entrada de água, bem como dos aminoácidos que participam dos contatos $\alpha_1 \beta_1$. Qualquer substituição na superfície interna causa instabilidade molecular, geralmente iniciando-se pela oxidação do grupo heme com a formação excessiva de metaemoglobina e precipitação da globina instável. Citologicamente é possível observar a precipitação intra-eritrocitária da globina instável por meio da presença de corpos de Heinz. Nesse grupo estão cerca de 300 tipos diferentes de Hb Instáveis.

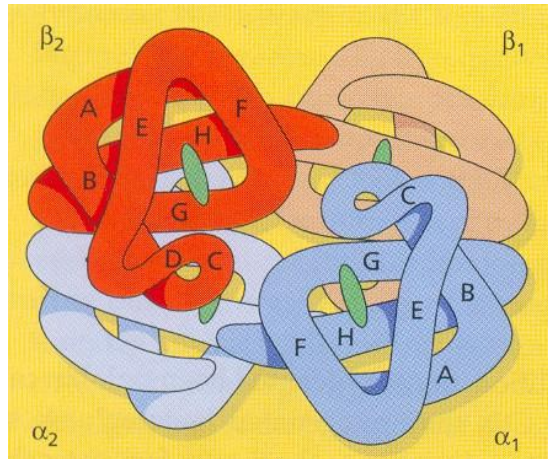


Figura 6.2: Estrutura do tetrâmero da Hb A com identificações de suas subunidades α_1 , α_2 , β_1 e β_2 . **Superfície externa:** corresponde aos aminoácidos das regiões A, B e F nas globinas alfa e beta. **Superfície interna:** D e C. **Grupo heme:** G e H.

- b) Substituições de aminoácidos que participam dos contatos $\alpha_1\beta_2$ (figura 6.2), das ligações químicas com o 2,3 DPG, e do resíduo histidina C-terminal da cadeia beta promovem a formação de hemoglobinas variantes com alterações na sua afinidade pelo oxigênio. São cerca de 50 tipos as Hb variantes com afinidade aumentada ou diminuída por oxigênio. As que têm afinidade aumentada se destacam por eritrocitoses, enquanto aquelas com afinidade diminuída manifestam-se notadamente por anemia hemolítica.
- c) Substituição dos resíduos de histidina distal ou proximal, que estão ligados ao grupo heme (HG na figura 6.2), causa anormalidades que se caracterizam pela oxidação espontânea e contínua do ferro, com formação excessiva de metaemoglobina, fato que dão origem às hemoglobinas variantes do tipo M (Hb M). Os portadores de Hb M são sempre cianóticos, com ou sem anemia.

- d) Adição de um ou mais aminoácidos ao último aminoácido (C-terminal) das globinas alfa e beta, tornando-as longas e manifestando-se como fenótipos talassêmicos alfa e beta (ex.: Hb Tak).
- e) Fusão entre duas cadeias de globinas diferentes, em especial das cadeias delta-beta que resultam na formação da hemoglobina variante conhecida por Hb Lepore. A fusão inversa, ou seja, beta-delta é conhecida por Hb anti-Lepore. Outras fusões têm sido descritas na literatura e todas essas ocorrências se devem ao "crossing-over" desigual no pareamento dos cromossomos 11.

Assim, somam-se atualmente perto de 900 variantes estruturais, poucas delas associadas com manifestações clínicas e alterações hematológicas, que podem ser agrupadas em:

- hemoglobinas de agregação;
- hemoglobinas sem alterações fisiológicas;
- hemoglobinas instáveis;
- hemoglobinas com alterações funcionais;
- hemoglobinas com fenótipos talassêmicos.

As hemoglobinas de agregação formam tactóides e cristais, com repercussões clínicas e laboratoriais variáveis. As hemoglobinas S e C participam desse grupo.

As hemoglobinas variantes que não causam alterações funcionais são a maioria, perto de 500 tipos diferentes, e embora apresentem importância bioquímica, genética e antropológica, não produzem efeitos clínicos e laboratoriais significantes.

As hemoglobinas instáveis apresentam graus variáveis de manifestações clínicas e hematológicas, expressando-se laboratorialmente de forma diversificada entre os diferentes tipos.

As hemoglobinas com alterações funcionais causam metaemoglobinas por Hb M, cianose e alteração de afinidade da hemoglobina pelo oxigênio.

As hemoglobinas com fenótipos talassêmicos são as variantes provocadas por falhas no processo de regulação da síntese de globina pela adição de aminoácidos ao C-terminal das globinas alfa e beta e pelo pareamento desigual do cromossomo 11 no processo da mitose celular.

As tabelas 6.1 e 6.2 resumem algumas das hemoglobinas variantes relacionadas com os defeitos estruturais, os genótipos, seus efeitos nos eritrócitos, além de doenças específicas causadas por estas hemoglobinas.

Tabela 6.1: Exemplos de hemoglobinas variantes estruturais e seus efeitos fisiopatológicos.

Hb variante	Defeito estrutural	Genótipos	Efeitos nos eritrócitos
S	β 6 Glu $\rightarrow$ Val	AS, SS, SF, SD, SC, SH	Falcização
C	β 6 Glu $\rightarrow$ Lis	AC, CC, CF, SC	Cristais de Hb
E	β 26 Gli $\rightarrow$ Lis	AE, EE	Hemólise
Koln ⁽¹⁾	β 96 Val $\rightarrow$ Met	A + Koln	Heinz e hemólise
Niterói ⁽¹⁾	β 44 a 46 deletados	A + Niterói	Heinz e hemólise
Malmo ⁽²⁾	β 97 His $\rightarrow$ Glu	A + Malmo	Eritrocitose
Kansas ⁽³⁾	β 102 Asn $\rightarrow$ Tre	A + Kansas	Metahemoglobina
Lepore	fusão δ - β	A + Lepore	Microcitose
Kenya	fusão γ - β	A + Kenya	Nenhuma
B ₂ ⁽⁴⁾	δ 16 Gli $\rightarrow$ Arg	A + B ₂	Nenhuma
F Texas ⁽⁵⁾	γ 5 Glu $\rightarrow$ Lis	A + F Texas	Nenhuma

(1) Há vários tipos de hemoglobinas instáveis; (2) Há vários tipos de hemoglobinas com afinidade aumentada por O₂; (3) Há poucos tipos de hemoglobinas com afinidade diminuída por O₂; (4) Há vários tipos de variantes de Hb A₂ por mutação na globina delta; (5) Há vários tipos de variantes de Hb Fetal, somente detectáveis em sangue de recém-nascidos.

Tabela 6.2: Doenças causadas por hemoglobinas variantes estruturais.

Anemia hemolítica e oclusão vascular falcizante
• Hb SS, Hb SS/Tal. alfa, Hb SS/PHHF • Hb SD, Hb SC • Hb S / Talassemia beta
Anemia hemolítica com excreção urinária de dipirróis
• Hemoglobinas instáveis: Hb Köln, Hb Duarte, Hb Zurique, Hb Genova, Hb Seattle, Hb Niterói, etc.
Eritrocitose hereditária
• Hemoglobinas com afinidade aumentada por O₂: Hb Chesapeake, Hb Malmö, Hb Kempsey, Hb Hiroshima, etc.
Metahemoglobina hereditária e cianose
• Hemoglobina M (Boston, Iwate, Milwaukee, Hyde Park, Saskatoon)
Outras formas de cianose hereditária
• Hb variante com afinidade diminuída por O₂: Hb Kansas
Anemia microcítica e hipocrômica
• Talassemias beta interativas com Hb variantes: (Hb S/Tal.beta, Hb C/Tal.beta, Hb D/Tal.beta) • Hb Lepore (fusão de globinas $\delta \beta$) • Hb Constant Spring (alongamento da globina alfa)

Hemoglobinas variantes comuns no Brasil

Hemoglobina S (Hb S) – Será apresentada por completo no capítulo 7.

Hemoglobina C (Hb C) – Foi descrita pela primeira vez por Itano e Neel em 1950, e em 1958 Hunt e Ingram identificaram que o aminoácido número 6 da globina beta, o ácido glutâmico (Glu), havia sido substituído pela lisina (Lis). Devido à diferença de carga elétrica envolvida (Glu, pI = 3,22 → Lis, pI = 9,74), a globina β^C tornou-se muito menos negativa, fato que sua mobilidade é muito lenta em eletroforese alcalina quando comparada com Hb A, S ou Lepore (figura 6.3).

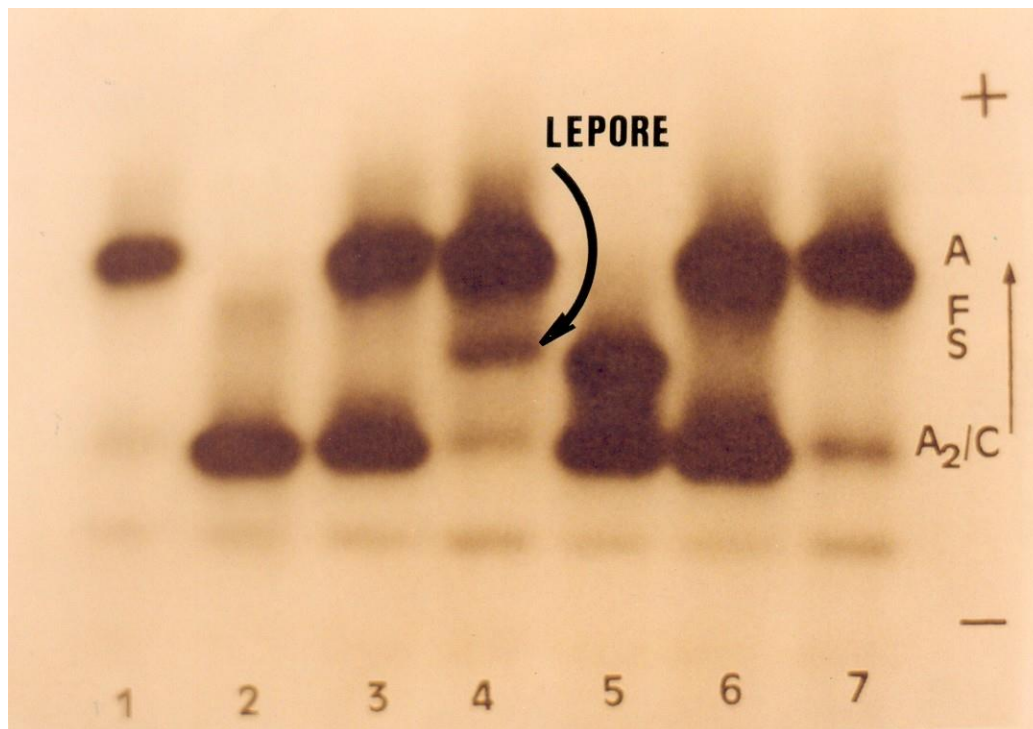


Figura 6.3: Eletroforese alcalina de hemoglobina em acetato de celulose.

(1) Hb AA; (2) Hb CC; (3) Hb AC; (4) Hb A + Lepore;
(5) Hb SC; (6) Hb AC e (7) Hb A + A₂ Aumentada.

Entre as hemoglobinas variantes, o genótipo heterozigoto da Hb C, ou Hb AC, é o segundo mais prevalente após a Hb AS, na população brasileira, variando entre 0,3% a 1,0%. A homozigose da Hb C (ou Hb CC) é rara e é caracterizada por anemia hemolítica de intensidade variável, com evidências clínicas de cansaço, fraqueza e, eventualmente, esplenomegalia. Laboratorialmente a hemoglobina total oscila entre 9 e 12g/dL, hematócrito entre 30 e 40%, leve a moderada reticulocitose (3 a 7%) e no esfregaço sangüíneo há muitas células em alvo. Eletroforeticamente, a homozigose da Hb C tem concentração de 98% desta hemoglobina, em pessoas com idade superior a seis meses. Outras condições associadas de Hb C com manifestações clínicas são a doença falciforme por Hb SC, que será apresentada no capítulo 7 (Doença Falciforme), e a interação entre Hb C e talassemia beta, ou Hb C/Tal. beta cuja avaliação eletroforética se torna visível pela Hb CF (figura 6.4). Diferentemente da Hb CC, que não se detecta Hb Fetal com níveis acima do normal, na Hb C/Tal. beta a Hb Fetal geralmente está elevada (>5%). Nesses casos as evidências clínicas são marcadas por palidez, cansaço e esplenomegalia. Laboratorialmente a anemia é moderada (Hb: 9 – 10g/dl) do tipo microcítica, hipocrômica, muitas células em alvo e reticulocitose acima de 5%.

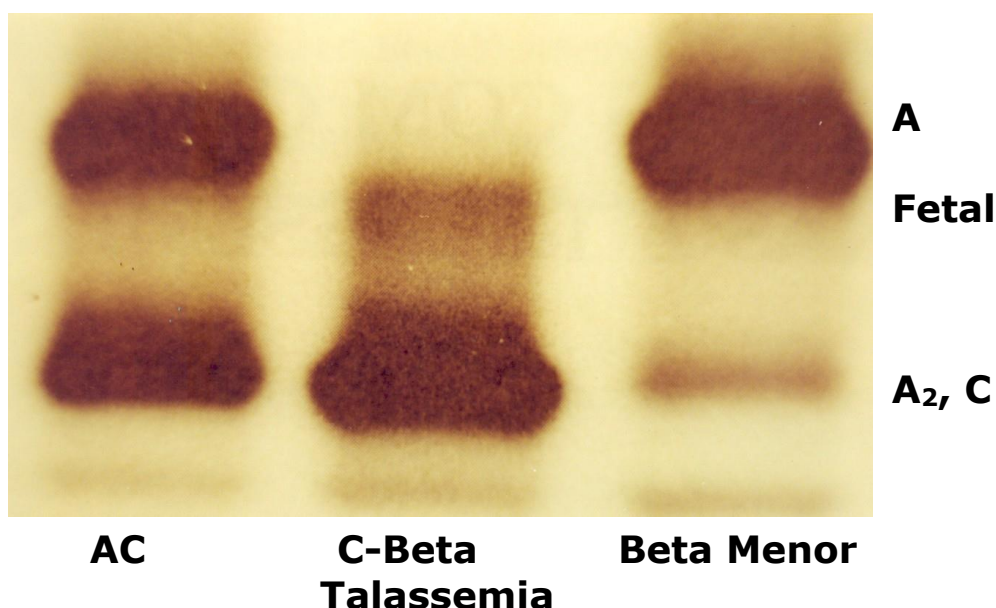


Figura 6.4: Eletroforese em acetato de celulose com pH alcalino (pH 8,6) mostrando da esquerda para a direita: Hb AC, Hb CF (C/Tal. beta) e Hb A + A₂ aumentada. Observar que a Hb Fetal tem concentração acima de 5%. A avaliação quantitativa da Hb Fetal pode ser efetuada por densitometria da eletroforese, ou por dosagem bioquímica de Hb Fetal.

Hemoglobina D (ou Hb D) – A Hb D é uma hemoglobina variante que apresenta a mesma mobilidade da Hb S em eletroforese de pH alcalino. É separável da Hb S por eletroforese em agar pH ácido (pH 5 a 6), e também por não se insolubilizar em soluções redutoras de oxigênio. Quando associada à Hb A, a heterozigose de Hb AD, o portador é totalmente assintomático, e a fração anormal constitui entre 30 e 50% da hemoglobina total. A prevalência de portadores de Hb AD no Brasil é por volta de 1 caso para cada 5 mil pessoas analisadas. Casos de homozigoses de Hb D (Hb DD) são raríssimos, e podem estar associados a discreto grau de anemia (Hb: 10,5 – 12,0 g/dl). Para estabelecer o diagnóstico de homozigose deve-se excluir cuidadosamente, por estudos familiares, a interação da Hb D com a talassemia beta. Na Hb D/Tal. beta é comum evidenciar no hemograma anemia microcítica e hipocrômica, com hemoglobina total variável de 9,5

a 12 g/dL, VCM abaixo de 77 fl e HCM também abaixo de 27 pg. Situação que oferece dificuldade no diagnóstico laboratorial ocorre quando há associação entre hemoglobinas S e D, ou Hb SD caracterizando um dos tipos que compõe o grupo das doenças falciformes, apresentado no capítulo 7. Neste caso específico, a eletroforese de hemoglobina em pH alcalino não diferencia o genótipo SS do SD, bem como o teste de falcização que é positivo em ambos. O teste mais adequado para a diferenciação é a eletroforese em agarose de pH ácido: a Hb S é mais lenta que a Hb D, que se posiciona igual à Hb A (figura 6.5).

Após ter sido descrita em 1953, várias outras hemoglobinas que se posicionavam como a Hb D (e não falcizavam) foram estruturalmente diferenciadas conforme o tipo de substituição de aminoácidos. Assim surgiram as Hb D Los Angeles ou Punjab (a mais frequente entre todas as hemoglobinas variantes que migram na mesma posição da Hb S), Hb D Iran, Hb D Ibadan, etc. todas na posição de Hb S. Atualmente, há dezenas de hemoglobinas variantes que migram na posição de S ou D e que foram denominados por local de origem e que são diferenciadas em eletroforeses em ágar ácido, isofocalização, HPLC, e por biologia molecular. A tabela 6.3 mostra a relação de hemoglobinas que migram na mesma posição de Hb S em pH alcalino, e suas diferenciações estruturais.

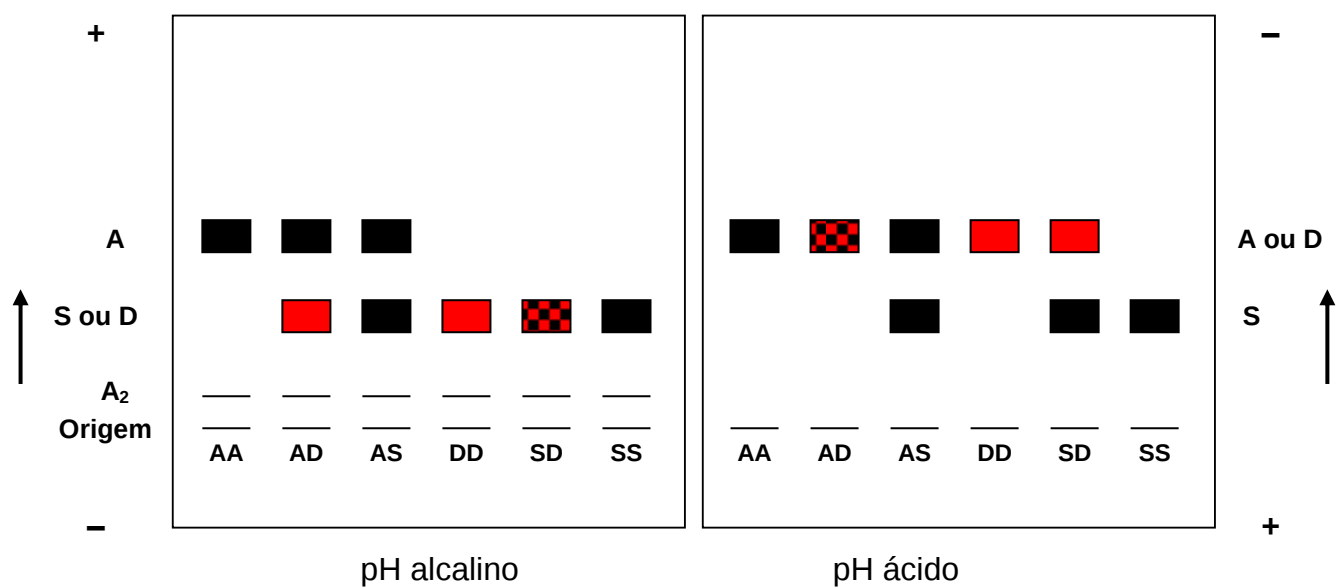


Figura 6.5: Mapa representativo dos principais genótipos de Hb D comparados com Hb A e Hb S, em eletroforeses de pH alcalino e ácido.

Tabela 6.3: Relação das principais hemoglobinas variantes que migram na posição de Hb S em eletroforese de pH alcalino, que são raríssimas e menos freqüente que Hb D Los Angeles.

Hemoglobina	Mutação	Concentração (%)	Agarose ácida**	Outras informações
Memphis	α 23: Glu→ Gln	< 30	S	
Hasharon	α 47: Asp→ His	< 15	S	Instável
Seally	α 47: Asp→ His	< 20	A	
Arya	α 47: Asp→ Asn	< 20	A	
Montgomery	α 48: Leu→ Arg	< 20	A	
Russ	α 51: Gli → Arg	< 15	A	
Persepolis	α 64: Asp→ Tir	< 20	C	
Daneshgah	α 72: His→ Arg	< 30	A	
D Bushman	β 16: Gli → Arg	25 – 40	A	
D Iran	β 22: Glu → Gln	25 – 40	A	
Alabama	β 39: Glu → Lis	25 – 40	A	
Ocho-Rios	β 52: Asp → Ala	25 – 40	C	
Osu-Christianborg	β 52: Asp→ Asn	25 – 40	A	
Korle-Bu	β 73: Asp→ Asn	25 – 40	A	
P	β 117: His→ Arg	> 40	A	Hipocromia
D Los Angeles	β 121: Glu→Gln	25 – 40	A	
D Beograd	β 121: Glu→Val	25 – 40	A	
S-Antilhas*	β 23: Val → Ile	25 – 40	A	
S-Providence*	β 82: Lis → Asn	25 – 40	A	
S-Oman*	β 121: Glu →Lis	25 – 40	A	
S-Travis*	β 142: Ala → Val	25 – 40	S ≠ A	
Lepore	Fusão δ - β	< 20	A	Microcitose e Hipocromia

* Duplas mutações na globina beta, além das mutações apresentadas todas tem a mutação da Hb S (β 6 Glu → Val). ** Posição eletroforética similar. ≠ Entre Hb A e Hb S.

Hemoglobina G (ou Hb G) – É um grupo de hemoglobinas variantes que migram pouco atrás da Hb S nas eletroforeses alcalinas em acetato de celulose e agarose. A diferenciação se faz por meio de eletroforese em agarose ácida. Entre as hemoglobinas do tipo G destacam Hb G Audhali (α 23 Glu $\rightarrow$ Val), Hb G Waimanalo (α 64 Asp $\rightarrow$ Asn), Hb Filadelfia (α 68 Asn $\rightarrow$ Lis), Hb G Galveston (β 43 Glu $\rightarrow$ Ala), Hb G Copenhagen (β 47 $\rightarrow$ Asn), Hb G Accra (β 79 Asp $\rightarrow$ Asn), entre outras. A Hb G Filadélfia é a mais frequente entre todos os tipos de Hb G, e em especial no Brasil e USA, pois sua origem é africana. Tem baixa prevalência na população brasileira (cerca de 1: 15000), porém, por ser comum entre pessoas de descendência africana e se situar eletroforéticamente na região próxima da Hb S em eletroforese alcalina, sua avaliação é sempre importante. Por ser a Hb G Filadélfia uma mutante de globina alfa, geralmente afetando um dos quatro genes alfa, sua concentração é quase sempre abaixo de 25%; além disso, quando em heterozigose com a Hb A (Hb AG), é possível separar as seguintes hemoglobinas, conforme mostra a figura 6.6:

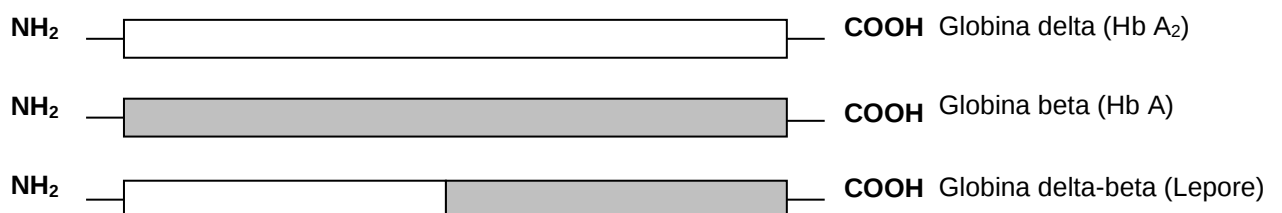
Hb A	:	($\alpha^A_2 \beta_2$)	:	70 – 80%
Hb G	:	($\alpha^G_2 \beta_2$)	:	20 – 25%
Hb A ₂	:	($\alpha^A_2 \delta_2$)	:	1 – 3%
Hb G ₂	:	($\alpha^G_2 \delta_2$)	:	0,5 – 1%
Hb Fetal	:	($\alpha^A_2 \gamma_2$)	:	0 – 1%
Hb G Fetal	:	($\alpha^G_2 \gamma_2$)	:	0 – 0,5%

Os portadores de Hb AG e Hb GG são assintomáticos, entretanto é possível a ocorrência da tripla heterozigose entre hemoglobinas A, S e G Filadélfia, proveniente de pais com Hb AS e Hb AG, conforme mostra o esquema a seguir:

Pais	→	Hb AS	x	Hb AG
Globinas	→	α^A / α^A β^A / β^S	α^G / α^A β^A / β^A	
Tripla heterozigose	→	$\alpha^A_2 \beta^A_2$ – Hb A $\alpha^A_2 \beta^S_2$ – Hb S $\alpha^G_2 \beta^A$ – Hb G $\alpha^G_2 \beta^S$ – SG (híbrido)		

A tripla heterozigose forma um quarto produto híbrido a Hb SG, conforme mostra a figura 6.7.

Hemoglobina Lepore (ou Hb Lepore) – A Hb Lepore é uma hemoglobina variante, com migração similar à Hb S (ver tabela 6.3), causada por um pareamento desigual do cromossomo 11 durante a meiose. Como consequência dessa desigualdade na posição das cromátides irmãs do cromossomo 11, o "crossing-over" entre elas promove a fusão de uma parte do gene delta com outra do gene beta, formando um **gene híbrido delta-beta**, além dos genes delta, gama e beta. Esse gene híbrido delta-beta sequencia globinas em que a parte inicial é formada por aminoácidos da globina delta e a parte final por aminoácidos da globina beta, conforme mostra o esquema a seguir:



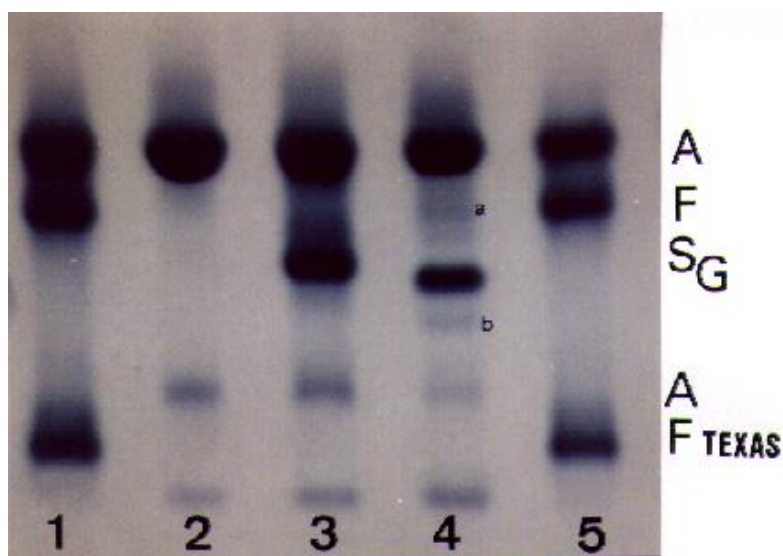


Figura 6.6: Eletroforese de hemoglobina em agarose com pH alcalino, com destaque para as mobilidades de Hb S e Hb G Filadélfia. (1) e (5) sangue de recém-nascido com Hb A + Hb Fetal + Hb Fetal Texas (mutante); (2) Hb AA; (3) Hb AS; (4) Hb AG, com Hb G Fetal (a) e Hb G₂ (b).

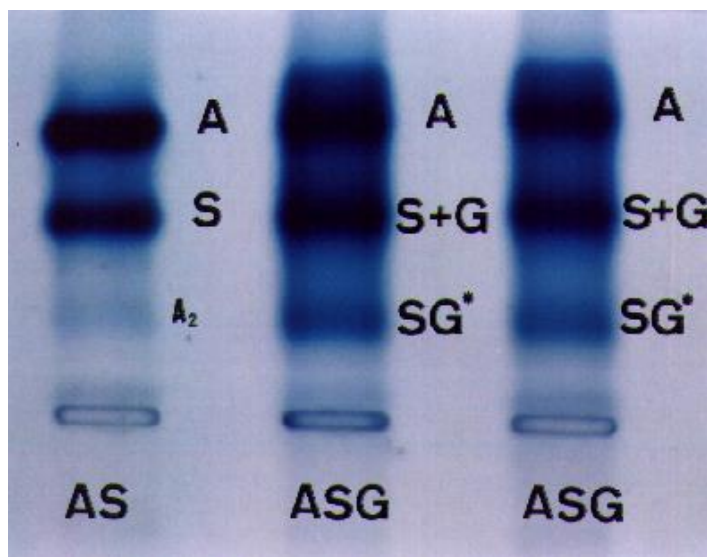


Figura 6.7: Eletroforese de hemoglobina em agarose com pH alcalino, com destaque para a tríplice heterozigose (Hb ASG). A Hb SG* é uma forma híbrida proveniente da combinação entre α^{G_2} e β^{S_2} .

Dependendo do local em que ocorre a fusão delta-beta a Hb Lepore pode originar pelo menos três sub-tipos: Lepore Boston, Lepore Baltimore e Lepore Holanda. Todas apresentam as mesmas características laboratoriais e eletroforéticas, sendo diferenciadas por estudos de composição peptídica da fusão delta-beta. A concentração da Hb Lepore em eletroforese alcalina é variável entre 5 e 15%, com Hb A₂ normal ou diminuída; algumas vezes a Hb Fetal pode estar elevada. Nesses casos, o quadro hematológico laboratorial é típico de talassemia beta menor com aniso-poiquilocitose, microcitose e hipocromia. Situação mais grave ocorre na homozigose da Hb Lepore, com quadro clínico e laboratorial semelhante à talassemia maior ou intermédia. A eletroforese de hemoglobina alcalina nas pessoas com Hb Lepore homozigota mostra a presença de Hb Fetal e Hb Lepore com concentrações elevadas. A figura 6.8 ilustra as situações da Hb Lepore heterozigota e homozigota.



Figura 6.8: Eletroforese de hemoglobinas em agarose alcalina mostrando em (1) Hb Lepore heterozigota com concentração de 5%; (2) Hb Lepore homozigota, com Hb Fetal $\pm$ 70%, Hb Lepore $\pm$ 15%, Hb A (transfundida) $\pm$ 15%, e traços de Hb A₂; (3) Hb SF de um paciente com Hb S/ β talassemia, com globinas alfa livre; (4) Hb AC. Observe na amostra 2 que a acentuada elevação de Hb Fetal prejudicou o fracionamento entre a Hb A e Hb Lepore.

Listagem das Hemoglobinas Variantes

Há cerca de 900 tipos diferentes de hemoglobinas variantes descritas na literatura científica. Desse total, cerca de 300 são Hb Instáveis e que serão abordadas no capítulo 9 – Hb Instáveis); aproximadamente 100 variantes têm atividades funcionais específicas, ex.: metaemoglobinemia por Hb M, Hb variantes com afinidade aumentada ou diminuída pelo oxigênio, etc.; e cerca de 500 variantes sem alterações fisiopatológicas (excetuando as Hb S e Hb C) importantes, ex.: Hb D, Hb J, Hb N, Hb O Anab, etc.

Para que seja possível fazer uma consulta rápida a algum tipo de Hb variante de interesse do leitor nós propomos fazer uma abordagem referencial, baseada na sua posição eletroforética, usando eletroforese alcalina (pH 8 – 9) em meios de acetato de celulose ou em gel de agarose. Assim, consideraremos sete posições padrões em eletroforese alcalina para efeito agrupamos cerca de 100 Hb variantes: Hb A (padrão normal), Hb Fetal, Hb S, Hb C (todas mais lentas que a Hb A) e Hb K, Hb J e Hb I (ambas mais rápidas que a Hb A) conforme mostra a figura 6.9.

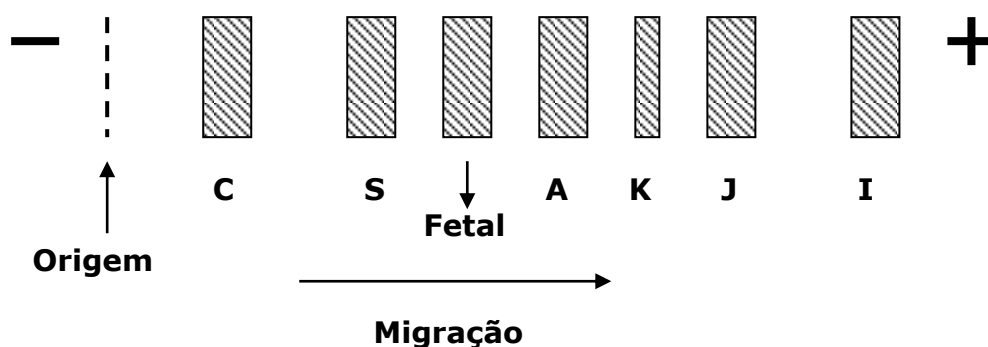


Figura 6.9 – Posições padrão de Hb A em relação às hemoglobinas Fetal, S e C (lentas) e J e I (rápidas).

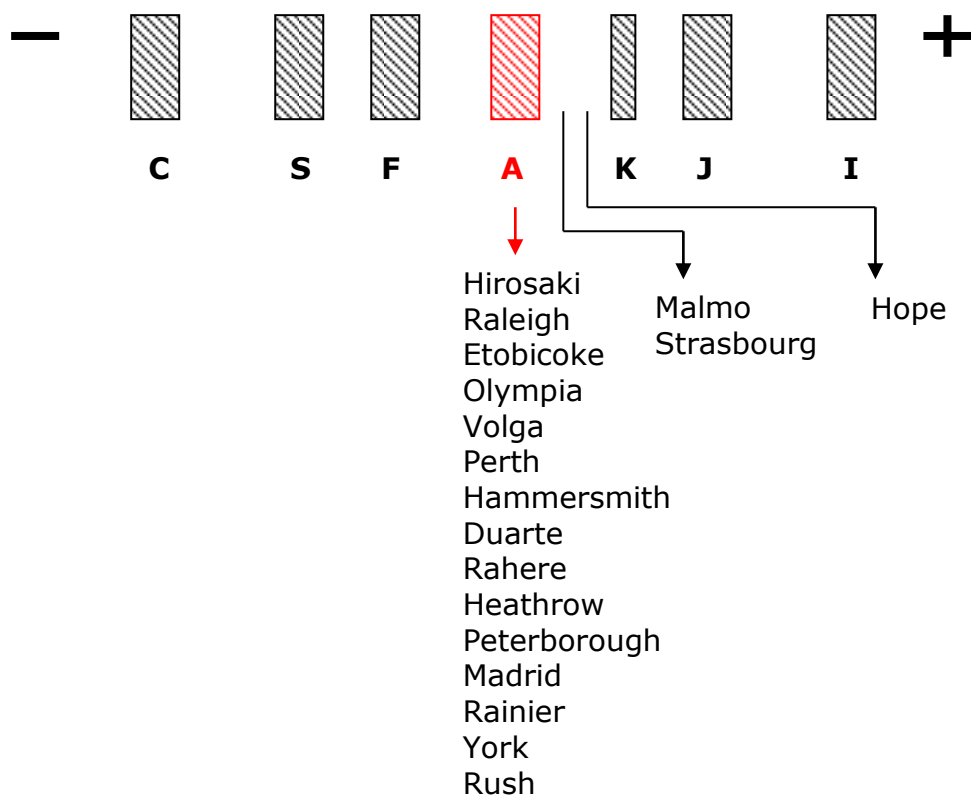
As Hb variantes causadas por mutações em globinas alfa e beta, descritas com maior frequência na literatura, serão agrupadas conforme suas similaridades nas sete posições padrões da figura 6.9. As mutantes de globinas delta e gama serão apresentadas posteriormente. Para cada grupo descrito será indicado:

- Mutação de aminoácido(s) na globina
- Posição na eletroforese em agar-ácido (pH 5 a 6)
- Eritrograma
- Teste(s) específico(s) de rotina analítica
- Características da hemoglobina

As descrições serão iniciadas pelo grupo de variantes similares à Hb A, seguido na sequência das lentas (Fetal, S e C) e das rápidas (K, J e I).

Hb variantes similares à Hb A

Essas variantes se devem a mutações que ocorrem geralmente na superfície interna da molécula, nos contatos $\alpha^1\beta^1$ e $\alpha^2\beta^2$ que dão estabilidade e nos contatos $\alpha^1\beta^2$ e $\alpha^2\beta^1$ responsáveis pela movimentação molecular durante a oxigenação. Por essas razões a maioria das trocas de aminoácidos envolvem os dos tipos hidrofóbicos e com pI muito próximos. Assim, essas mutações não alteram a mobilidade eletroforética alcalina, mas podem causar hemoglobinas instáveis ou hemoglobinas com problemas na afinidade pelo oxigênio. A figura abaixo destaca as principais Hb variantes e suas posições similares ou próximas da Hb A que serão descritas conforme o seu posicionamento em eletroforese em gel de ágar ácido, eritrograma, teste específico e alguma característica de fundamental importância.



Hb Hirosaki (α 47 Fen – Leu)

Eletrof. ágar-ácido: similar à Hb A

Eritrograma: anemia hemolítica

Teste específico: Pesquisa de Heinz: +

Instabilidade: +

Característica: Hb Instável

Hb Raleigh (β_1 Val – Ala)

Eletrof. ágar-ácido: similar à Hb Fetal

Eritrograma: anemia hemolítica

Teste específico: Afinidade diminuída ao O_2

Característica: Hb com alteração funcional

Hb Etobicoke (α 84 Ser – Arg)

Eletrof. ágar-ácido: similar à Hb A

Eritrograma: anemia hemolítica

Teste específico: Pesquisa de Heinz: +

Instabilidade: +

Característica: Hb Instável

Hb Olympia (β 20 Val – Met)

Eletrof. ágar-ácido: similar à Hb A

Eritrograma: eritrocitose

Teste específico: afinidade aumentada ao O₂

Característica: Hb com alteração funcional

Hb Volga (β 27 Ala – Asp)

Eletrof. ágar-ácido: similar à Hb A

Eritrograma: anemia hemolítica

Teste específico: Pesquisa de Heinz: +

Instabilidade: +

Característica: Hb Instável

Hb Perth (β 32 Leu – Pro)

Eletrof. ágar-ácido: similar à Hb A

Eritrograma: anemia hemolítica

Teste específico: Pesquisa de Heinz: +

Instabilidade: +

Característica: Hb Instável

Hb Hammersmith (β 42 Fen – Ser)

Eletrof. ágar-ácido: similar à Hb A

Eritrograma: anemia hemolítica

Teste específico: Pesquisa de Heinz: +

Instabilidade: +

Característica: Hb Instável com cianose

Hb Duarte (β 62 Ala – Pro)

Eletrof. ágar-ácido: similar à Hb A

Eritrograma: eritrocitose

Teste específico: afinidade aumentada ao O₂

Característica: Hb com alteração funcional

Hb Rahere (β 82 Lis – Tre)

Eletrof. ágar-ácido: similar à Hb Fetal

Eritrograma: eritrocitose

Teste específico: afinidade aumentada ao O₂

Característica: Hb com alteração funcional

Hb Heathrow (β 103 Fen – Leu)

Eletrof. ágar-ácido: similar à Hb A

Eritrograma: eritrocitose

Teste específico: afinidade aumentada ao O₂

Característica: Hb com alteração funcional

Hb Peterborough (β 111 Val – Fen)

Eletrof. ágar-ácido: similar à Hb Fetal

Eritrograma: anemia

Teste específico: Pesquisa de Heinz: +

Instabilidade: +

Característica: Hb Instável

Hb Madrid (β 115 Ala – Pro)

Eletrof. ágar-ácido: similar à Hb A

Eritrograma: anemia e reticulocitose

Teste específico: Pesquisa de Heinz: +

Instabilidade: +

Característica: Hb Instável

Hb Rainier (β 145 Tir – Cis)

Eletrof. ágar-ácido: entre Hb A e Hb S

Eritrograma: eritrocitose

Teste específico: afinidade aumentada ao O₂

Característica: Hb com alteração funcional

Hb York (β 146 His – Pro)

Eletrof. ágar-ácido: entre Hb A e Hb Fetal

Eritrograma: eritrocitose

Teste específico: afinidade aumentada ao O₂

Característica: Hb com alteração funcional

Hb Rush (β 101 Glu – Gln)

Eletrof. ágar-ácido: similar à Hb A

Eritrograma: anemia hemolítica

Teste específico: Instabilidade: +

MetaHb: aumentada

Obs.: em eletroforese alcalina pH 8,0 migra entre Hb A e Hb S

Característica: Hb Instável

Hb Malmo (β 97 His – Gln) (Figuras 5.10 e 5.11)

Eletrof. ágar-ácido: entre Hb A e Hb Fetal

Eritrograma: eritrocitose

Teste específico: afinidade aumentada ao O₂

Característica: Hb com alteração funcional

Obs.: ver figuras 6.10 e 6.11

Hb Strasbourg (β 23 Val – Asp)

Eletrof. ágar-ácido: similar à Hb A

Eritrograma: eritrocitose

Teste específico: afinidade aumentada ao O₂

Característica: Hb com alteração funcional

Hb Hope (β 136 Gly – Asp)

Eletrof. ágar-ácido: similar à Hb Fetal

Eritrograma: normal

Teste específico: afinidade diminuída ao O₂

Característica: Hb com alteração funcional

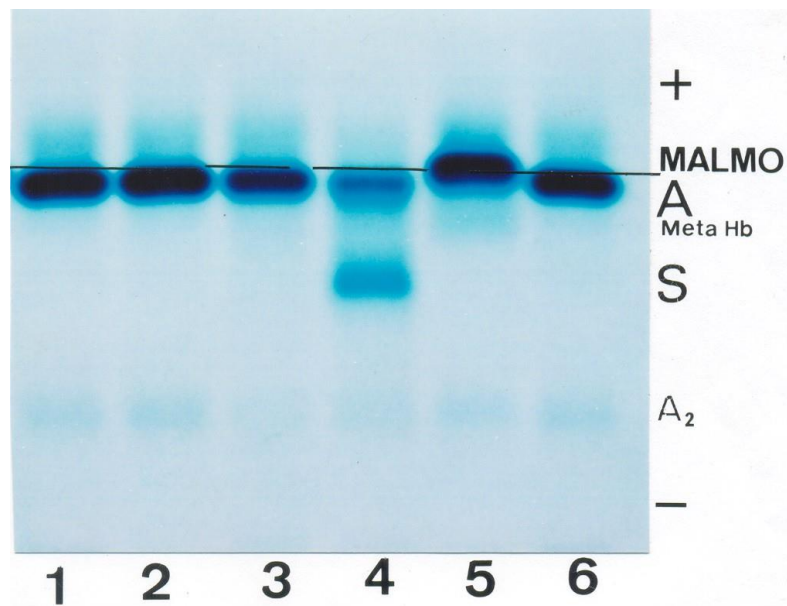


Figura 6.10 – Eletroforese alcalina em acetato de celulose mostrando a posição eletroforética de Hb Malmo discretamente mais rápida que a Hb A. O risco traçado é para mostrar a sutil diferença. Hb AA (1, 2, 3, 6); Hb AS (4); Hb A + Malmo (5).

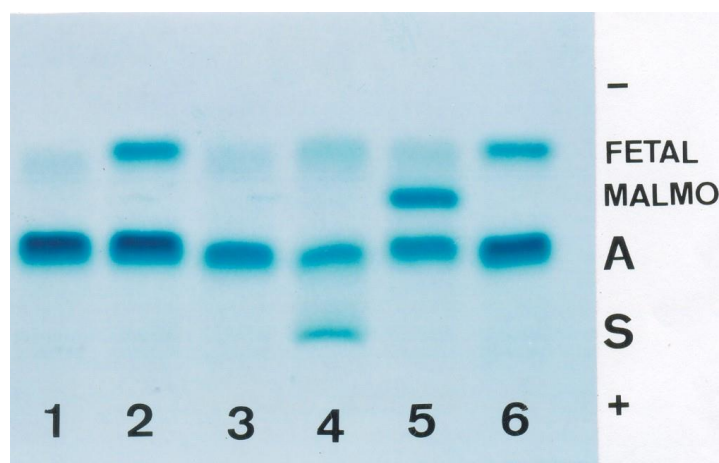
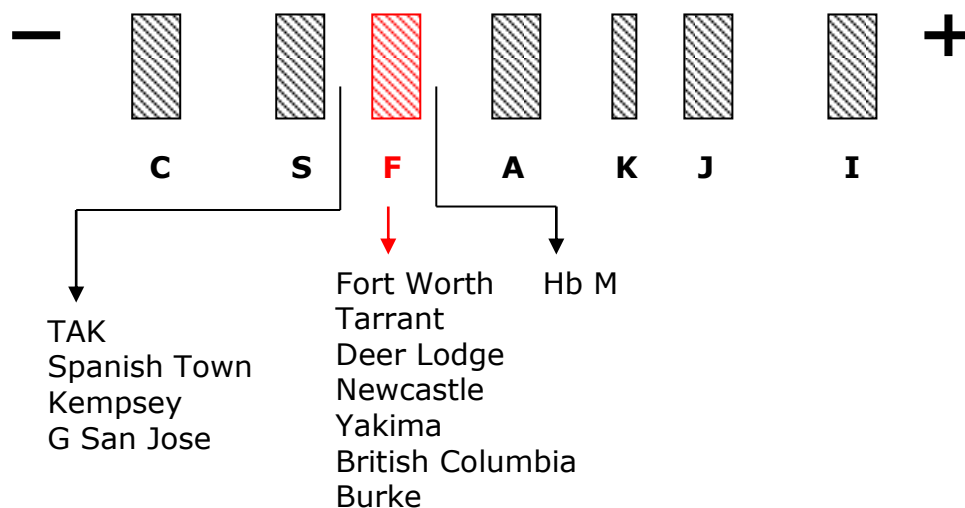


Figura 6.11 – Eletroforese em agarose ácida. A Hb Malmo separou-se da Hb A e situa-se entre esta e a Hb Fetal. Hb AA (1 e 3); Hb AF (2 e 6); Hb AS (4); Hb A + Malmo (5).

Foto: Cortesia do Laboratório Santa Luzia de Florianópolis.

Hb variantes similares à Hb Fetal

A maioria das variantes que se posicionam como se fossem Hb Fetal, ou próximo dessa posição padrão, se devem a mutações que envolveram trocas de aminoácidos de pI diferentes, ex.: Glu → Gli, Glu → Asn, ou seja, se perde carga negativa de Glu ou Asp em troca de aminoácidos neutros ("sem carga"). Algumas dessas trocas ocorrem em regiões internas que podem afetar a estabilidade ou a oxigenação. A figura abaixo apresenta algumas das principais variantes na posição da Hb Fetal, ou próximo a ela. Na descrição detalhada de cada variante será apresentada sua concentração média em heterozigose.



Hb Fort Worth (α 27 Glu – Gli)

Eletrof. ágar-ácido: similar à Hb A

Eritrograma: fenótipo de talassemia menor

Teste específico: concentração de Hb = 5 a 10%

Característica: Hb variante com fenótipo talassêmico

Hb Tarrant (α 126 Asp – Asn)

Eletrof. ágar-ácido: similar à Hb S

Eritrograma: eritrocitose

Teste específico: afinidade aumentada ao O₂

Característica: Hb com alteração funcional
Concentração de Hb = 20%

Hb Deer Lodge (β 2 His – Arg)

Eletrof. ágar-ácido: similar à Hb A

Eritrograma: normal

Teste específico: baixa afinidade ao O₂

Característica: Hb com alteração funcional
Concentração de Hb = 40%

Hb Newcastle (β 92 His – Pro)

Eletrof. ágar-ácido: similar à Hb A

Eritrograma: anemia hemolítica

Teste específico: Pesquisa de Heinz: +

Instabilidade: +

Característica: Hb Instável
Concentração de Hb = 17%

Hb Yakima (β 99 Asp – His)

Eletrof. ágar-ácido: similar à Hb S

Eritrograma: eritrocitose

Teste específico: afinidade aumentada ao O₂

Característica: Hb com alteração funcional
Concentração de Hb = 35%

Hb British Columbia (β 101 Glu – Lis)

Eletrof. ágar-ácido: similar à Hb C

Eritrograma: normal

Teste específico: afinidade aumenta ao O₂

Característica: Hb com alteração funcional
Concentração de Hb = 50%

Hb Burke (β 107 Gli – Arg)

Eletrof. ágar-ácido: similar à Hb S

Eritrograma: anemia hemolítica

Teste específico: Pesquisa de Heinz: +

Instabilidade: +

Característica: Hb Instável
Concentração de Hb = 30%

Hb Tak (inserção de aminoácidos na C-terminal da globina alfa)

Eletrof. ágar-ácido: similar à Hb S

Eritrograma: fenótipo de talassemia menor

Teste específico: afinidade aumentada ao O₂

Característica: Hb com alteração funcional
Concentração de Hb = 30%

Hb Spanish Town (α 27 Glu – Val)

Eletrof. ágar-ácido: similar à Hb A

Eritrograma: normal

Teste específico: concentração: 12%

Característica: Hb variante sem alterações fisiológicas

Hb Kempsey (β 99 Asp – Asn)

Eletrof. ágar-ácido: similar à Hb Fetal

Eritrograma: eritrocitose

Teste específico: afinidade aumentada ao O₂

Característica: Hb variante com alteração fisiológica

Concentração: 30%

Hb G San Jose (β 7 Glu – Gli) (Figura 5.12)

Eletrof. ágar-ácido: entre Hb S e Hb C

Eritrograma: normal

Teste específico: concentração: 40%

Característica: Hb variante sem alterações fisiológicas (figura 6.12)

Hb M- M Boston (α 58 His – Tir)

M Iwate (α 87 His – Tir)

M Saskatoon (β 63 His – Tir)

M Hyde Park (β 92 His – Tir)

Eritrograma: anemia variável e cianose

Teste específico: curva de meta hemoglobina

Característica: Metaemoglobina elevada

Paciente cianótico

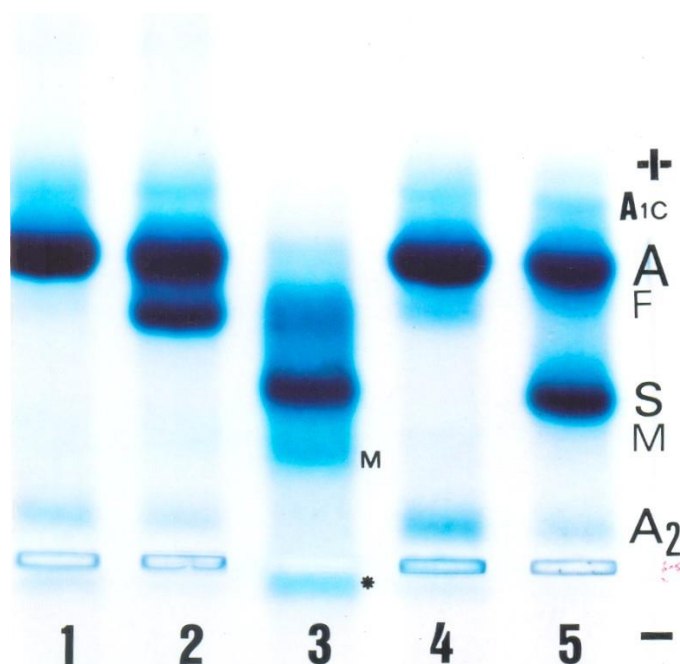


Figura 6.12 – Eletroforese alcalina de hemoglobina em gel de agarose. (1) Hb AA; (2) Hb A + G San Jose; (3) Hb SFM; (4) Hb AF + A₂ aumentada; (5) Hb AS.

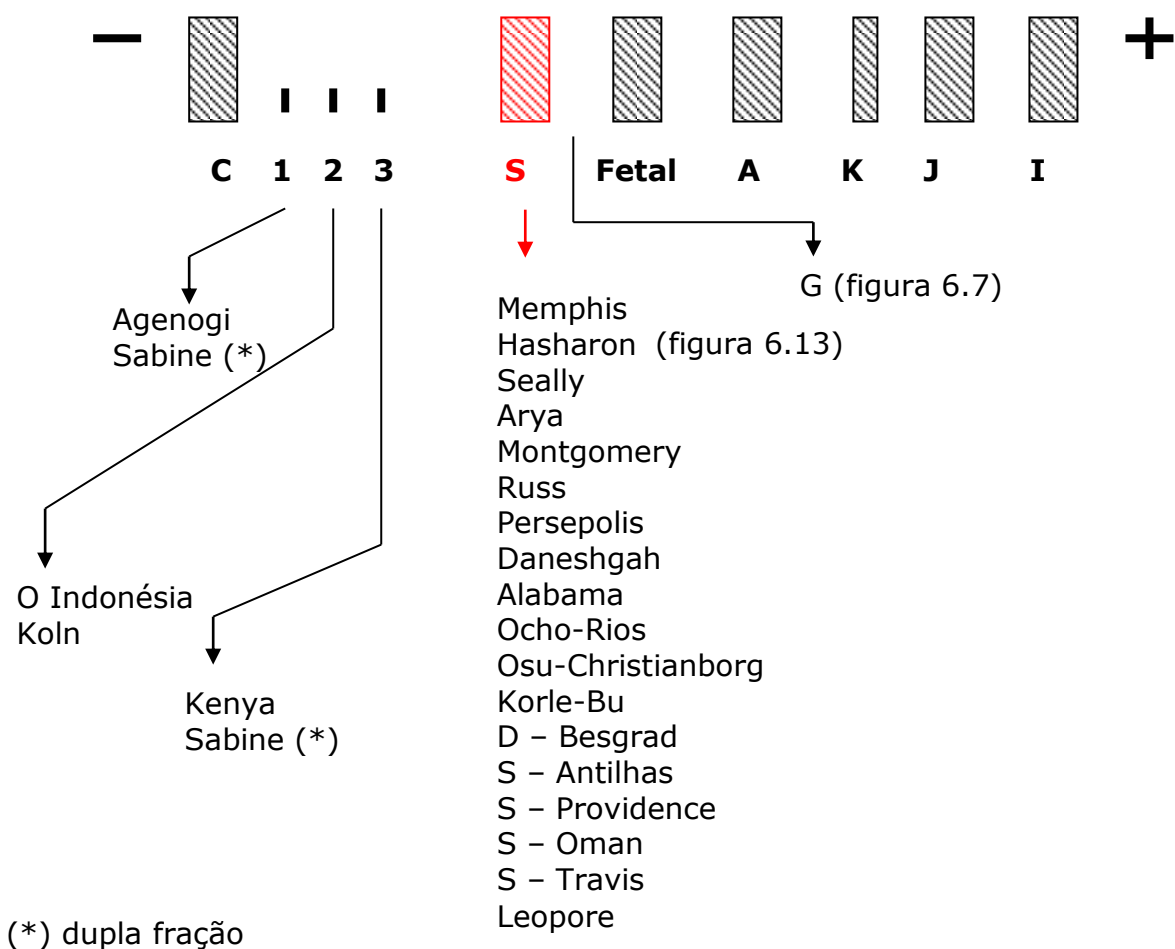
Obs.: A amostra 3 é um caso de Hb S associada a talassemia beta ou S/Beta Talassemia, a letra **M** significa a posição da MetaHb S e o asterisco (*) indica a presença de globina alfa livre devido à talassemia beta. A amostra 4 é um caso de talassemia beta menor com Hb A₂: 5,6% e Hb Fetal: 4,8%.

Hb variantes similares à Hb S

Um representativo número de Hb variantes migra na mesma posição que da Hb S. A maioria é diferenciada pela eletroforese ácida, com exceção da Hb Memphis e da Hb Hasharon. Quase todas as mutações das Hb Variantes que migram na posição da Hb S ocorreram na superfície ou região externa da globina alfa ou beta, locais que não

produzem efeitos deletérios à molécula. Algumas outras, entretanto, caracterizadas como Hb Instáveis, tem mutações em regiões estabilizadoras ($\alpha^1\beta^1$ ou $\alpha^2\beta^2$) e regiões invariantes.

Como será possível observar, o posicionamento eletroforético dessas hemoglobinas se deve à troca de aminoácidos geralmente com cargas negativas (Glu e Asp) por outros com cargas neutras (Val, Gln, Ala, etc.). Incluiremos algumas Hb Variantes que se posicionam também entre Hb S e Hb C, conforme mostra a figura abaixo:



Todas as Hb Variantes listadas na posição eletroforética da Hb S tem suas características referentes a mutação, concentração e eletroforese em agar-ácido apresentadas na tabela 6.3.

Descreveremos a seguir as Hb Variantes que se posicionam na região intermediária entre Hb S e Hb C.

Hb Hasharon (α 47 Asp – His)

Eletrof. ágar-ácido: similar à Hb S

Eritrograma: discreta anemia microcítica e hipocrômica

Teste específico: concentração: 10 – 17%

Característica: Hb variante discretamente instável

Hb Azenogü (β 90 Glu – Lis)

Eletrof. ágar-ácido: entre Hb S e Hb C

Eritrograma: normal

Teste específico: concentração: 40 – 45%

Característica: Hb variante com alteração fisiológica

Hb Sabine (β 91 Leu – Pro) (figura 6.14)

Eletrof. ágar-ácido: similar à Hb A

Eritrograma: anemia hemolítica

Teste específico: Pesquisa de Heinz: +

Instabilidade: +

Característica: Hb Instável com duas posições eletroforéticas entre Hb S e Hb C (figura 6.14).

Concentração total de: 10%

Hb O Indonésia (α Glu – Lis)

Eletrof. ágar-ácido: entre Hb A e Hb S

Eritrograma: normal

Teste específico: concentração: 26%

Característica: Hb variante sem alteração fisiológica

Hb Köln (β 98 Val – Met) (figura 6.15)

Eletrof. ágar-ácido: entre Hb A e Hb Fetal

Eritrograma: anemia hemolítica

Teste específico: Pesquisa de Heinz: +

Instabilidade: +

Característica: Hb Instável

Concentração: 10 a 15% (figura 5.15)

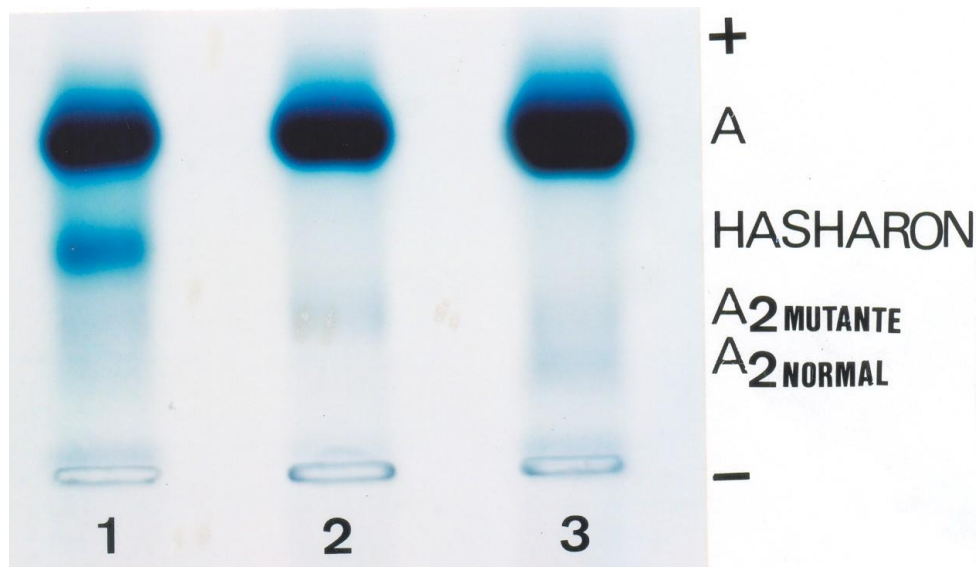


Figura 6.13 – Eletroforese alcalina de hemoglobinas em gel de agarose.

(1) Hb A + Hb Hasharon, que migra na mesma posição de Hb S; (2) Hb AA; (3) Hb A com Hb A₂ mutante (Hb A₂ Babinga)

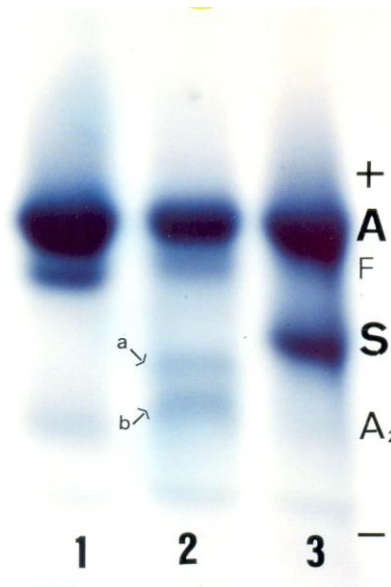


Figura 6.14 – Eletroforese alcalina de hemoglobina em acetato de celulose. (1) Hb A + Hb Fetal aumentada [12%]; (2) Hb A + Hb Sabine com duas frações a e b, e Hb Fetal aumentada [3,8%]; (3) Hb AS.

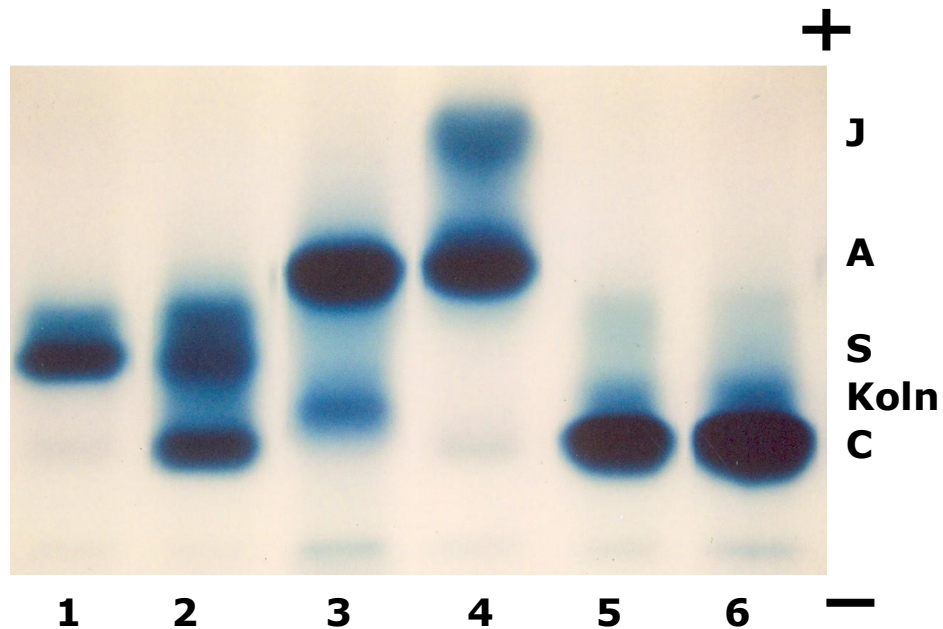
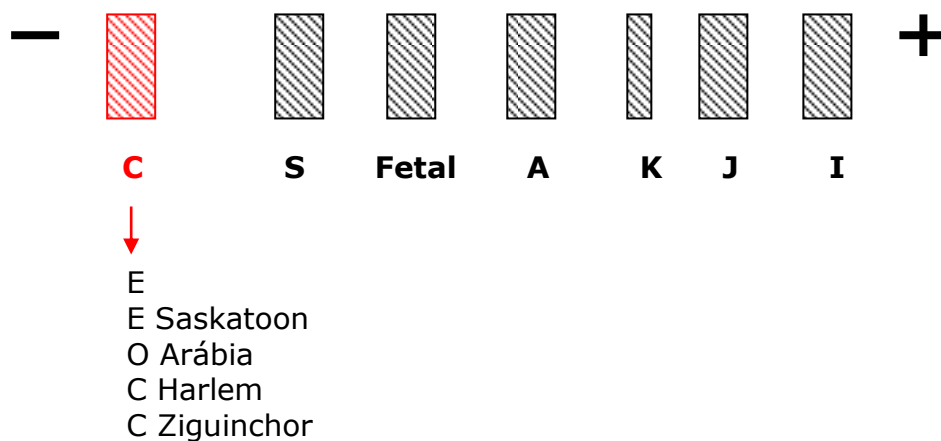


Figura 6.15 – Eletroforese alcalina de hemoglobinas em gel de agarose. (1) Hb SS; (2) Hb SC; (3) Hb A + Hb Koln; (4) Hb AJ; (5) e (6) Hb CC.

Hb variantes similares à Hb C

As Hb variantes que se posicionam na região da Hb C, com exceção da Hb E, não causam alterações fisiopatológicas, pois as mutações envolvem regiões externas da molécula. O posicionamento lento dessas hemoglobinas variantes se deve geralmente à troca de aminoácidos com cargas negativas (Glu e Asp) por outros de cargas positivas (Arg, Lis e His). É importante destacar que na região de Hb C situam-se a maioria dos mutantes de globinas delta, caracterizando as variantes de Hb A₂, que serão abordadas no final deste item.



Hb E (β 26 Glu – Lis)

Eletrof. ágar-ácido: similar à Hb A

Eritrograma: anemia microcítica

Teste específico: Instabilidade: +

Característica: Hb variante discretamente instável

Concentração: 20 a 25%

Hb E Saskatoon (β 22 Glu – Lis)

Eletrof. ágar-ácido: similar à Hb A

Eritrograma: normal

Teste específico: concentração: 40%

Característica: Hb variante sem alteração fisiológica

Hb O Arábia (β 121 Glu – Lis)

Eletrof. ágar-ácido: discretamente mais lenta que a Hb A

Eritrograma: normal

Teste específico: concentração: 35 – 45%

Característica: Hb variante sem alterações fisiológicas

Hb C Harlem (β 6 Glu – Val / β 73 Asp - Asn)

Eletrof. ágar-ácido: similar à Hb S

Eritrograma: fenótipo falcêmico. Sem anemia na heterozigose

Teste específico: falcização positiva

Característica: Hb variante com fenótipo falcêmico

Concentração: 40%

Hb Ziguinchor (β 6 Glu – Val / β 58 Pro – Arg))

Eletrof. ágar-ácido: similar à Hb S

Eritrograma: fenótipo falcêmico. Sem anemia na heterozigose

Teste específico: falcização positiva

Característica: Hb variante com fenótipo falcêmico

Concentração: 35%

Hb variantes similares à Hb K

As hemoglobinas variantes com posicionamento discretamente mais rápido que a Hb A são em número reduzido. É provável que esse fato se deva à dificuldade de visualização ou da detecção por procedimentos eletroforéticos e cromatográficos. A figura 6.16 mostra a Hb K em heterozigose com a Hb A (AK) e é possível observar que a dificuldade na sua identificação eletroforética se deva à sua proximidade com a Hb A.

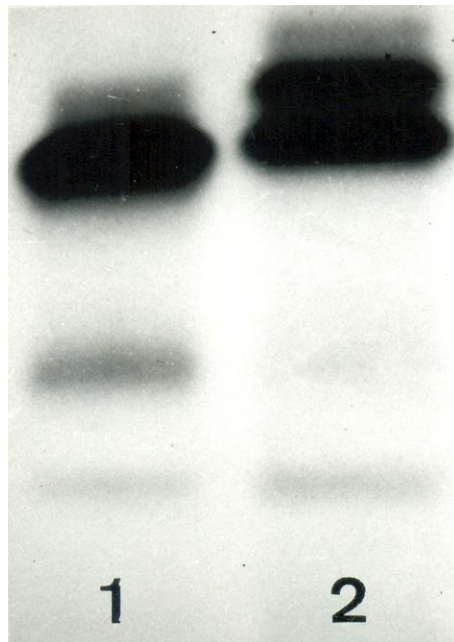
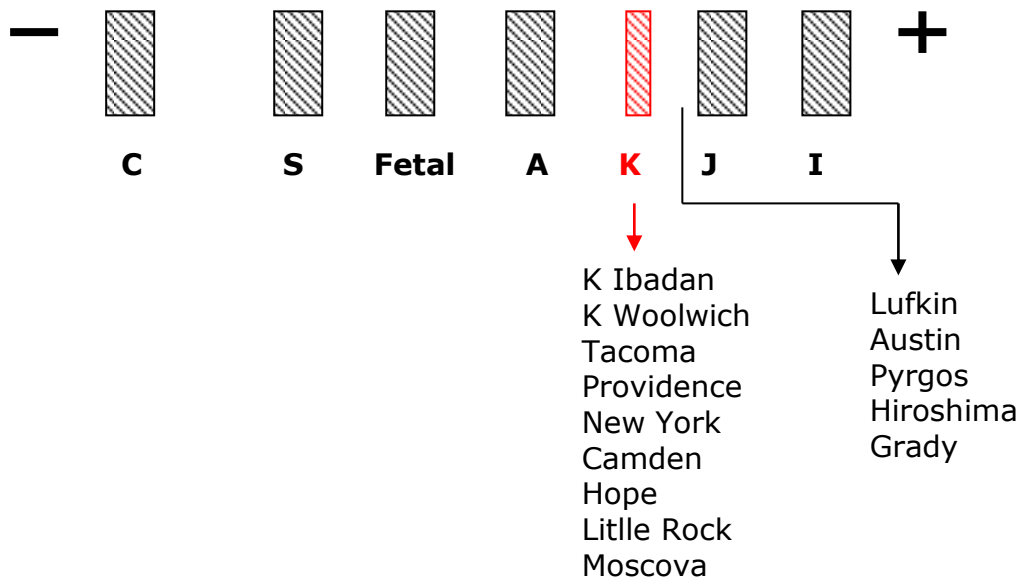


Figura 6.16 – Eletroforese alcalina de hemoglobina em acetato de celulose. (1) Hb AA com A₂ aumentada – paciente com talassemia beta menor; (2) Hb A + Hb K (Hb AK).

O posicionamento desse grupo de Hb variantes se deve a mutações que envolvem trocas de aminoácidos com ganho de carga negativa, por exemplo: um aminoácido neutro (Gli) é trocado por outro carregado negativamente (Glu). Entretanto a diferença de pI da molécula mutante em relação à Hb A é muito pequena e esse fato se caracteriza

pela discreta mobilidade rápida da Hb variante. A figura abaixo mostra algumas variantes típicas desse fracionamento.



Hb K Ibadan (β 46 Glu – Glu)

Eletrof. ágar-ácido: similar à Hb A

Eritrograma: normal

Teste específico: concentração: 45%

Característica: Hb variante sem alteração funcional

Hb K Woolwich (β 132 Lis – Gln)

Eletrof. ágar-ácido: similar à Hb Fetal

Eritrograma: fenótipo de talassemia beta menor

Teste específico: concentração: 35%

Característica: Hb variante com fenótipo talassêmico

Hb Tacoma (β 30 Arg – Ser)

Eletof. ágar-ácido: similar à Hb A

Eritrograma: normal

Teste específico: Instabilidade: +

Característica: Hb instável sem causar anemia

Concentração: 40%

Hb Providence (β 82 Lis – Ans)

Eletof. ágar-ácido: dupla fração próximo à Hb Fetal

Eritrograma: normal

Teste específico: dupla fração na região de Hb K

Característica: Hb variante com dupla fração

Concentração total: 50%

Hb New York (β 113 Val – Glu)

Eletof. ágar-ácido: similar à Hb A

Eritrograma: normal

Teste específico: Instabilidade: +

Característica: Hb instável sem causar anemia

Concentração: 50%

Hb Camden (β 131 Gln – Glu)

Eletof. ágar-ácido: entre Hb A e Hb Fetal

Eritrograma: normal

Teste específico: concentração: 35 – 45%

Característica: Hb variante sem alterações fisiológicas

Hb Hope (β 136 Gli – Asp)

Eletrof. ágar-ácido: similar à Hb Fetal

Eritrograma: normal

Teste específico: afinidade diminuída ao O₂

Característica: Hb variante com alteração fisiológica

Hb Little Rock (β 143 His – Gln)

Eletrof. ágar-ácido: similar à Hb Fetal

Eritrograma: eritrocitose

Teste específico: afinidade aumentada ao O₂

Característica: Hb variante com alteração fisiológica

Hb Moscova (β 24 Gli – Asp)

Eletrof. ágar-ácido: similar à Hb A

Eritrograma: anemia hemolítica

Teste específico: Pesquisa de Heinz: +

Instabilidade: +

Característica: Hb variante instável

Concentração: 17%

Hb Lufkin (β 29 Gli – Asp)

Eletrof. ágar-ácido: similar à Hb A

Eritrograma: anemia hemolítica

Teste específico: Pesquisa de Heinz: +

Instabilidade: +

Característica: Hb variante instável

Concentração: 35%

Hb Austin (β 40 Arg – Ser)

Eletrof. ágar-ácido: entre Hb A e Hb Fetal

Eritrograma: normal

Teste específico: afinidade aumentada ao O₂

Característica: Hb variante com alteração funcional

Concentração: 45%

Hb Pyrgos (β 83 Gli – Asp)

Eletrof. ágar-ácido: entre Hb A e Hb Fetal

Eritrograma: normal

Teste específico: concentração 50%

Característica: Hb variante sem alteração fisiológica

Hb Hiroshima (β 146 His – Asp)

Eletrof. ágar-ácido: similar à Hb Fetal

Eritrograma: eritrocitose

Teste específico: afinidade aumentada ao O₂

Característica: Hb variante com alteração fisiológica

Concentração: 50%

Hb Grady (α 118 – 119 inserção de Glu – Fen – Ter)

Eletrof. ágar-ácido:

Eritrograma: normal

Teste específico: concentração: 15%

Característica: Hb variante sem alteração fisiológica

Hb variantes similares à Hb J

O número de hemoglobinas variantes com mobilidade rápida e descrita como similares à Hb J são cerca de 60 tipos. A maioria dessas variantes se deve a mutações na globina alfa e, por essa razão, suas

concentrações são abaixo de 25%. Esse fato decorre devido à mutação atingir apenas um gene alfa dos quatro existentes, assim admite-se que 25% da síntese de globina alfa esteja afetada.

A figura 6.17 mostra a eletroforese alcalina de dois casos de Hb AJ com mutação na globina alfa, comparada com amostras de Hb AA e Hb AS.

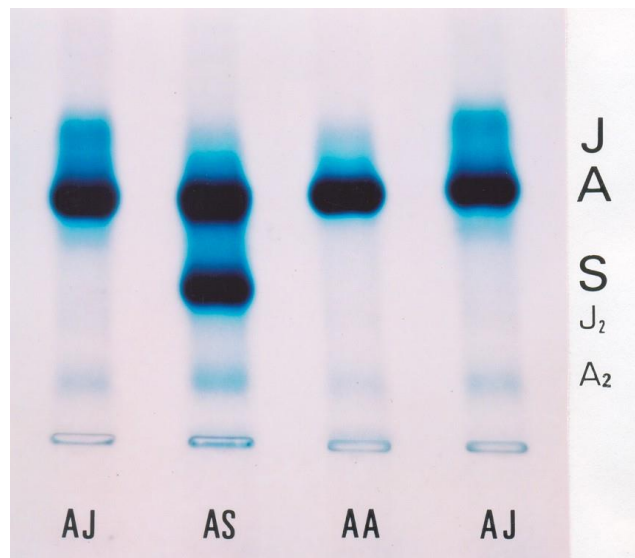


Figura 6.17 – Eletroforese alcalina de hemoglobina em gel de agarose, com o fracionamento de Hb AJ, Hb AS e Hb AA.

Por ser de fácil identificação as variantes que se posicionam na região de Hb J são descritas simplesmente como Hb J, destacando os locais de suas identificações: J Paris, J Oxford, etc. Mas há outras variantes que não incluem a letra J na sua identificação, conforme mostra a figura abaixo.

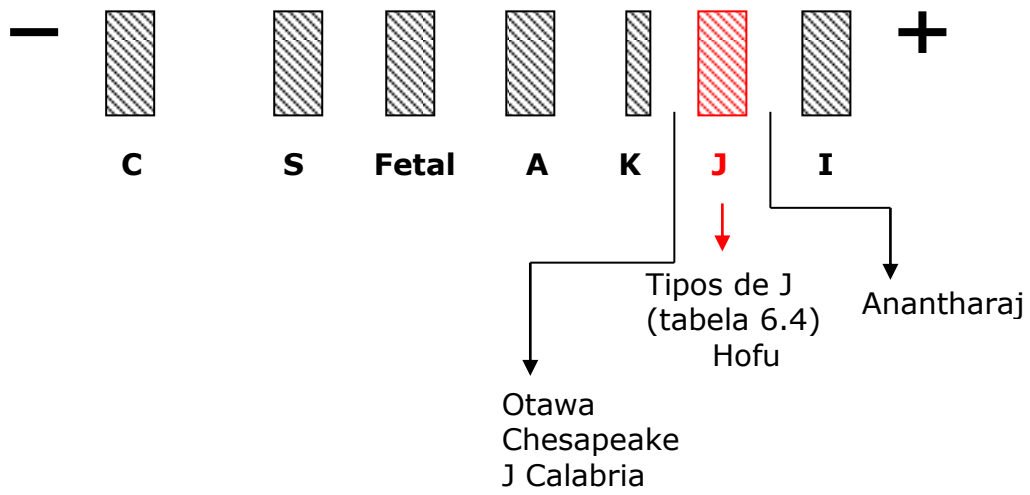


Tabela 6.4 – Identificação de 25 variantes denominadas por Hb J selecionadas entre as 62 descritas até o presente.

Hb J	Mutação	Eritrograma	Agar-ácido	Concent.	Alteração
Toronto	α 5 Ala-Asp	Normal	~ Hb A	20%	-
Wenchang	α 11 Lis-Glu	Normal	~ Hb A	20%	-
Paris	α 12 Ala-Asp	Normal	~ Hb A	25%	-
Oxford	α 15 Gli-Asp	Normal	~ Hb A	25%	-
Kurosh	α 19 Ala-Asp	Normal	~ Hb A	25%	-
Tashi	α 19 Ala-Glu	Anemia	~ Hb A	20%	-
Nyanza	α 21 Ala-Asp	Normal	~ Hb A	20%	-
Medellin	α 22 Gli-Asp	Normal	~ Hb A	17%	-
Sardegna	α 50 His-Asp	Normal	~ Hb A	25%	-
Abidjan	α 51 Gli-Asp	Normal	~ Hb A	23%	-
Rovigo	α 53 Ala-Asp	Normal	~ Hb A	20%	-
Buda	α 51 Lis-Asn	Normal	~ Hb A	20%	-
Habana	α 71 Ala-Glu	Normal	~ Hb A	18%	-
Singa	α 78 Asn-Asp	Normal	~ Hb A	27%	-
Broussais	α 90 Lis-Asn	Normal	~ Hb A	15%	-
Rajappan	α 90 Lis-Ter	Normal	~ Hb A	17%	-
Capetown	α 92 Arg-Gln	Eritrocitose	~ Hb A	20%	Afinidade ↑
Tangariki	α 115 Ala-Asp	Anemia	~ Hb A	20%	(tal. α)
Cubujuki	α 141 Arg-Ser	Normal	~ Hb A	18%	-
Lens	β 13 Ala-Asp	Normal	~ Hb A	35%	-
Baltimore	β 16 Gli-Asp	Normal	~ Hb A	40%	-
Bangkok	β 56 Gli-Asp	Normal	~ Hb A	33%	-
Lonie	β 59 Lis-Asn	Normal	~ Hb A	30%	-
Cambridge	β 69 Gli-Asp	Normal	~ Hb A	35%	-
Guantanamo	β 128 Ala-Asp	Anemia hemolítica	~ Hb A	37%	instável

Hb Hofu (β 126 Val – Glu)

Eletof. ágar-ácido: similar à Hb A

Eritrograma: normal

Teste específico: Instabilidade: +

Característica: Hb variante Instável

Concentração: 40%

Hb Ottawa (α 15 Gli – Arg)

Eletrof. ágar-ácido: similar à Hb A

Eritrograma: normal

Teste específico: concentração de 18%

Característica: Hb variante sem alteração funcional

Hb Chesapeake (α 92 Arg – Leu)

Eletrof. ágar-ácido: pouco mais lenta que a Hb A

Eritrograma: eritrocitose

Teste específico: Afinidade aumentada ao O₂

Característica: Hb variante com alteração funcional

Concentração: 25%

Hb J Calabria (β 64 Gli – Asp)

Eletrof. ágar-ácido: similar à Hb A

Eritrograma: normal

Teste específico: Concentração de 38%

Característica: Hb variante sem alteração funcional

Hb Anantaraj (α 11 Lis – Glu)

Eletrof. ágar-ácido: similar à Hb A

Eritrograma: normal

Teste específico: Concentração: 45%

Característica: Hb variante sem alteração fisiológica

Hb variantes similares à Hb I

São poucas as hemoglobinas variantes com a mobilidade rápida da Hb I. A similaridade de sua posição inclui, além de três diferentes tipos de Hb I, a Hb H (figuras 6.18 e 6.19) e as Hb N que se posicionam entre as Hb J e Hb I.

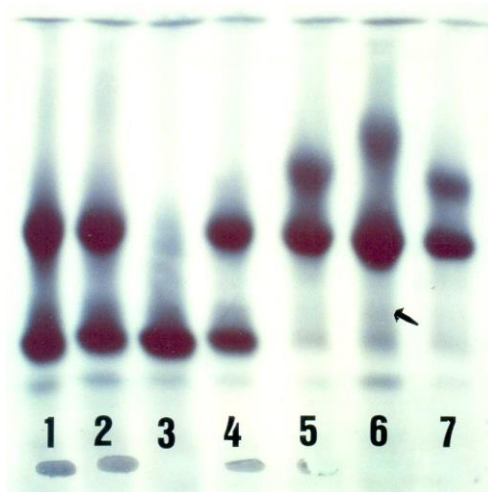


Figura 6.18 – Eletroforese alcalina, com destaque para as hemoglobinas rápidas J e I. (1), (2) e (4) Hb AC; (3) Hb CC; (5) e (7) Hb AJ; (6) Hb AI. Observar a fração I₂ ($\alpha_2^I \delta^A_2$) formada pelo fato da Hb I ser variante de globina alfa.

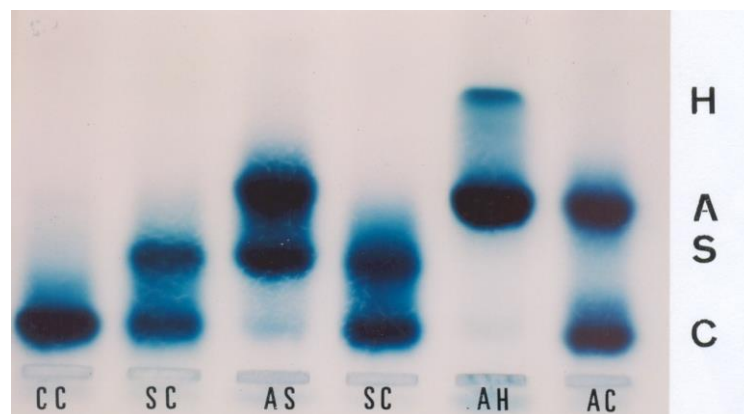
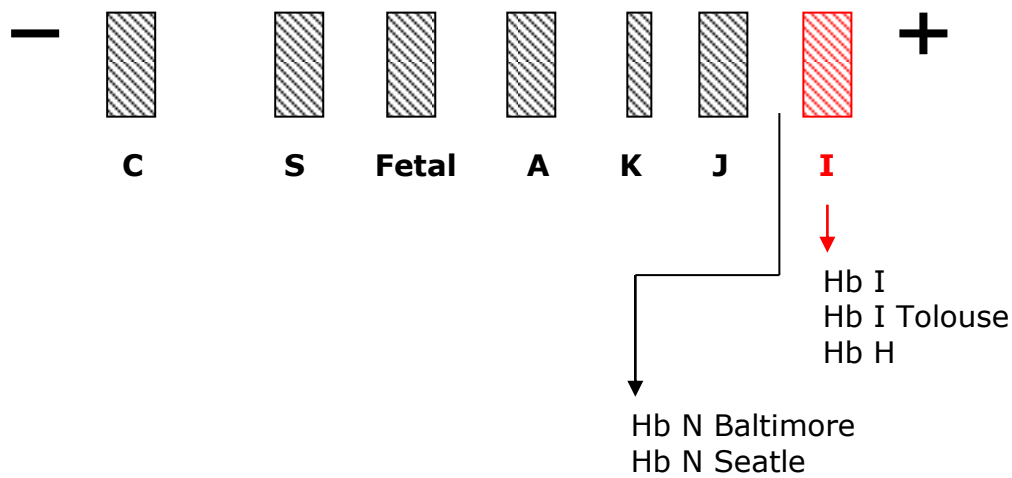


Figura 6.19 – Eletroforese alcalina de hemoglobinas em gel de agarose. Destaque para a posição da Hb H que migra na região de Hb I.

A rápida mobilidade da Hb I se deve à troca de cargas elétricas motivada por mutações que retiram aminoácidos de carga positiva (ex.: Lis) e a entrada de outros de carga negativa (ex.: Glu). Diante disso a fração se move com extrema rapidez no procedimento eletroforético. A figura abaixo representa a posição da Hb I com algumas

variantes que se posicionam de forma similar e outras discretamente menos rápidas.



Hb I (α 16 Lis – Glu)

Eletrof. ágar-ácido: similar à Hb A

Eritrograma: normal

Teste específico: Concentração: 25% - Hb I₂

Característica: Hb variante sem alteração fisiológica

Hb I Tolouse (β 66 Lis – Glu)

Eletrof. ágar-ácido: similar à Hb A

Eritrograma: anemia hemolítica

Teste específico: Pesquisa de Heinz: +

Instabilidade: +

Característica: Hb variante Instável

Concentração: 40%

Hb H (β_4 – Talassemia alfa)

Eletrof. ágar-ácido: similar à Hb A

Eritrograma: variável (normal – anemia)

Teste específico: Talassemia alfa

Característica: Concentrações de 0,5 a 25%

Hb N Baltimore (β 95 Lis – Glu)

Eletrof. ágar-ácido: similar à Hb A

Eritrograma: normal

Teste específico: Concentração: 50%

Característica: Hb variante sem alteração fisiológica

Hb N Seattle (β 61 Lis – Glu)

Eletrof. ágar-ácido: similar à Hb A

Eritrograma: normal

Teste específico: Concentração: 45%

Característica: Hb variante sem alteração fisiológica

Hemoglobinas variantes de Hb A₂

As variantes de Hb A₂ se devem a mutações que ocorrem na cadeia polipeptídica da globina delta. Há cerca de 15 variantes, todas com fenótipo normal; apenas duas apresentam alterações fisiológicas de instabilidade e aumento da afinidade pelo oxigênio, sem consequências para seus portadores. As concentrações dessas variantes são em torno de 0,5 a 1,8%, fato que muitas vezes passam despercebidos ao analista. Eletroforeticamente, metade dessas variantes se posicionam discretamente mais lentas que a Hb A₂ normal e a outra metade um pouco mais rápido, conforme mostra a figura abaixo de dez variantes de Hb A₂. A figura 6.20 mostra uma variante da Hb A₂ conhecida como A₂ Babinga que migra discretamente mais lenta que a Hb A₂ normal.

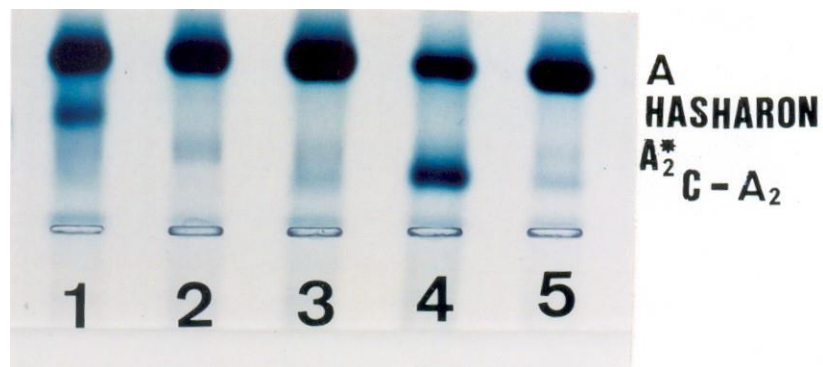
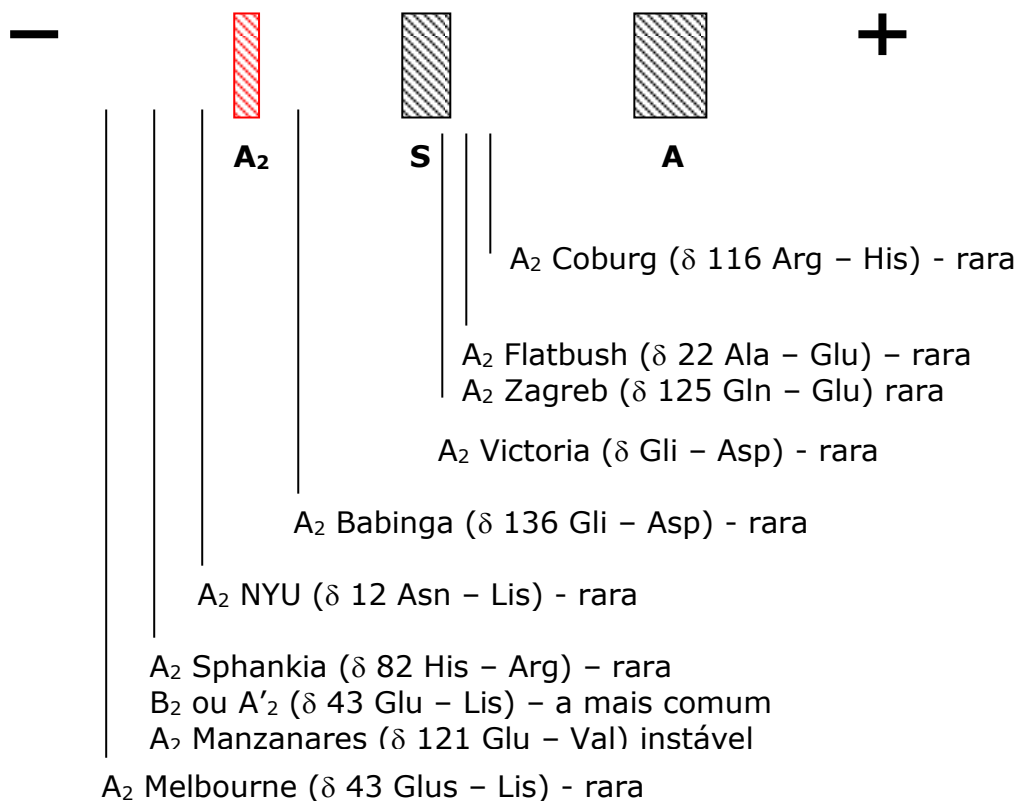


Figura 6.20 – Eletroforese alcalina de hemoglobina em gel de agarose. Da esquerda para a direita: (1) Hb A + Hasharon; (2) Hb A + Babinga (homozigose para Hb Babinga); (3) e (5) Hb A + A₂ Babinga (heterozigose para Hb Babinga; (4) Hb AC.

Hemoglobinas variantes de Hb Fetal

As variantes da Hb Fetal são identificadas somente no período entre o nascimento até o sexto mês de idade, quando há elevada concentração de Hb Fetal. Dessa forma, a quase totalidade das identificações dessas variantes são descritas em recém-nascidos. A figura 6.21 mostra a Hb F Texas, uma variante muito lenta da Hb Fetal que se posiciona eletroforéticamente atrás da Hb A₂ ou da Hb C. Como é possível notar nessa figura, o portador tinha Hb A + Hb Fetal + Hb Fetal Texas, pois era recém-nascido.

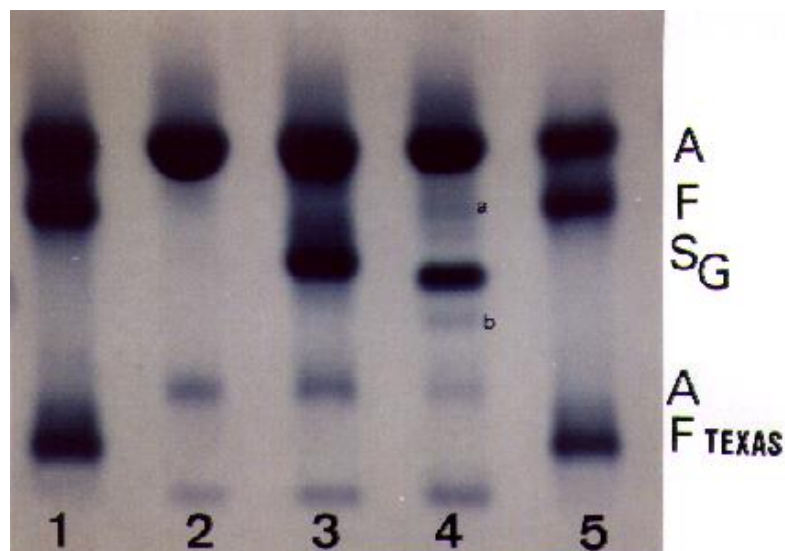
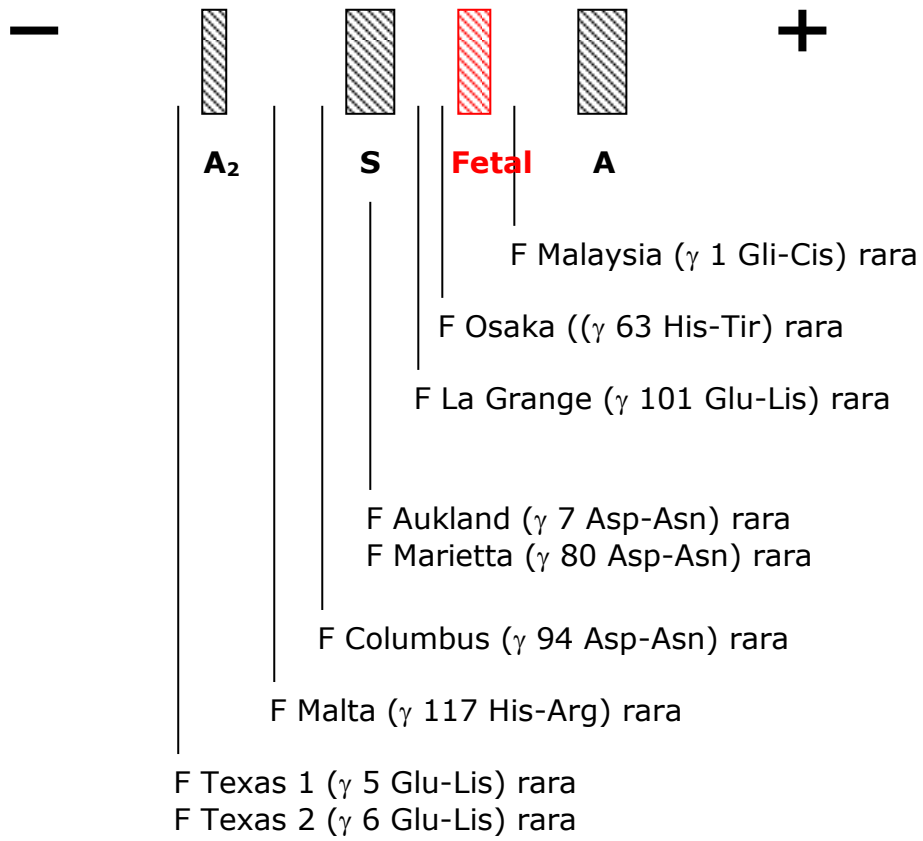


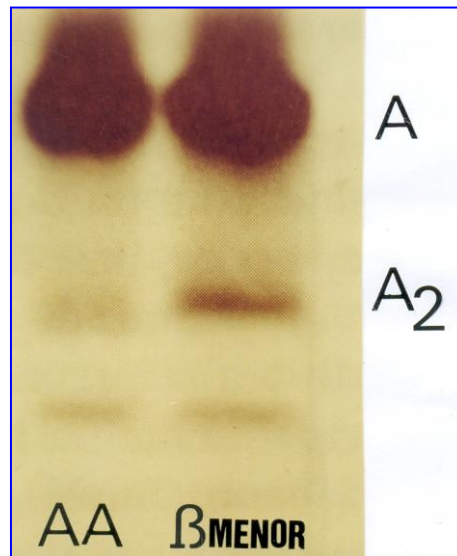
Figura 6.21 – Eletroforese de hemoglobina em agarose com pH alcalino, (1) e (5) Hb AF + F Texas; (2) Hb AA; (3) Hb AS; (4) Hb AG; (a) Hb Fetal; (b) Hb G₂.

Há cerca de quarenta variantes de Hb Fetal e quase todas são eletroforéticamente mais lentas, algumas entre Hb S e Hb A₂. Apenas três são mais lentas que a Hb A₂: Hb F Texas 1, Hb F Texas 2 e Hb F Carlton. A figura abaixo mostra algumas dessas variantes.



Análises eletroforéticas de hemoglobinas normais, anormais, variantes e associadas à talassemias.

1. HEMOGLOBINAS A e A₂



As hemoglobinas são proteínas complexas de estrutura quaternária que desempenham o transporte de oxigênio e participam do equilíbrio ácido-básico.

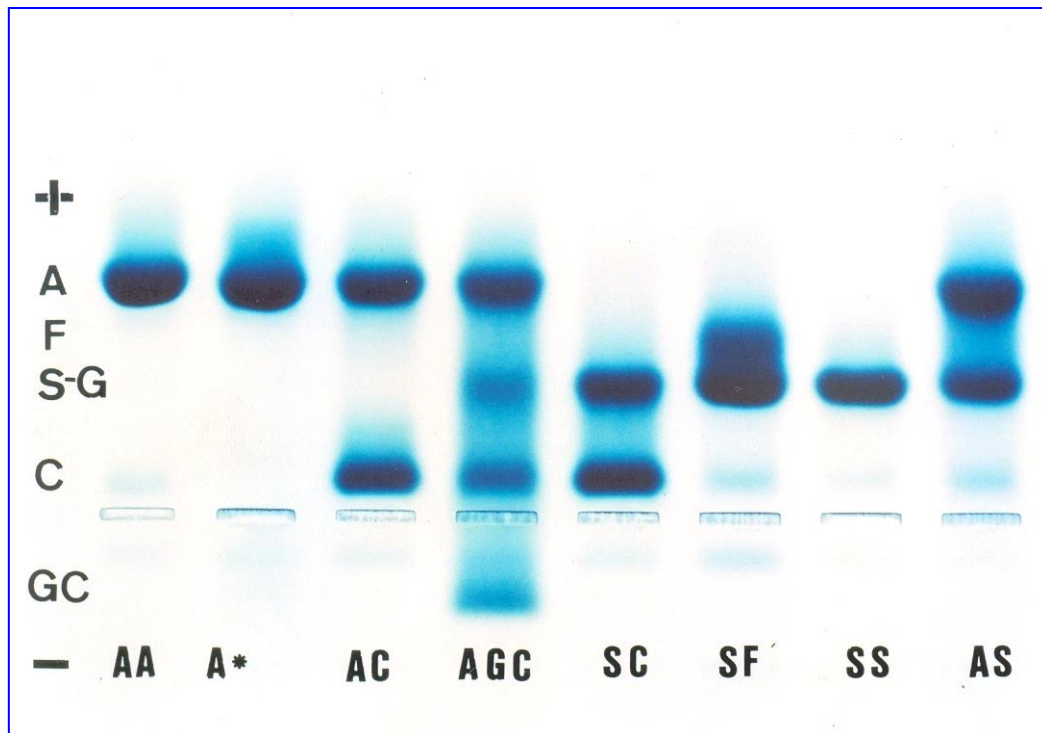
Cada eritrócito contém, em média, cerca de 300 milhões de moléculas de hemoglobinas (ex.: HCM = 30pg).

Após o sexto mês de vida de uma pessoa com síntese normal para hemoglobinas é possível identificar com clareza as Hb A e Hb A₂. Essa identificação se faz por métodos de fracionamento protéico, dos quais o mais conhecido é a eletroforese de acetato de celulose em pH alcalino. Além das Hb A e Hb A₂ pode aparecer a Hb Fetal, cuja concentração atinge no máximo 1%; na maioria das vezes está ausente. A concentração da Hb A é variável de 96 a 98% e a Hb A₂ de 2 a 4%.

Uma pessoa com concentrações normais para hemoglobinas A, A₂ e Fetal é identificada por Hb AA.

Quando a Hb A₂ está aumentada (>4% até 8%) é sugestivo de que o portador tenha talassemia beta menor. Para esses casos há necessidade de comprovações clínicas e hematológicas.

2. Hb VARIANTES COMUNS E RARAS



Esse grupo de oito análises mostra hemoglobinas normais (Hb AA), Hb variantes comuns (AC, SC, SF, SS e AS), Hb variante rara (AGC) e um caso em que a deficiência de ferro diminui a Hb A₂ (A*).

Análise específica de cada amostra:

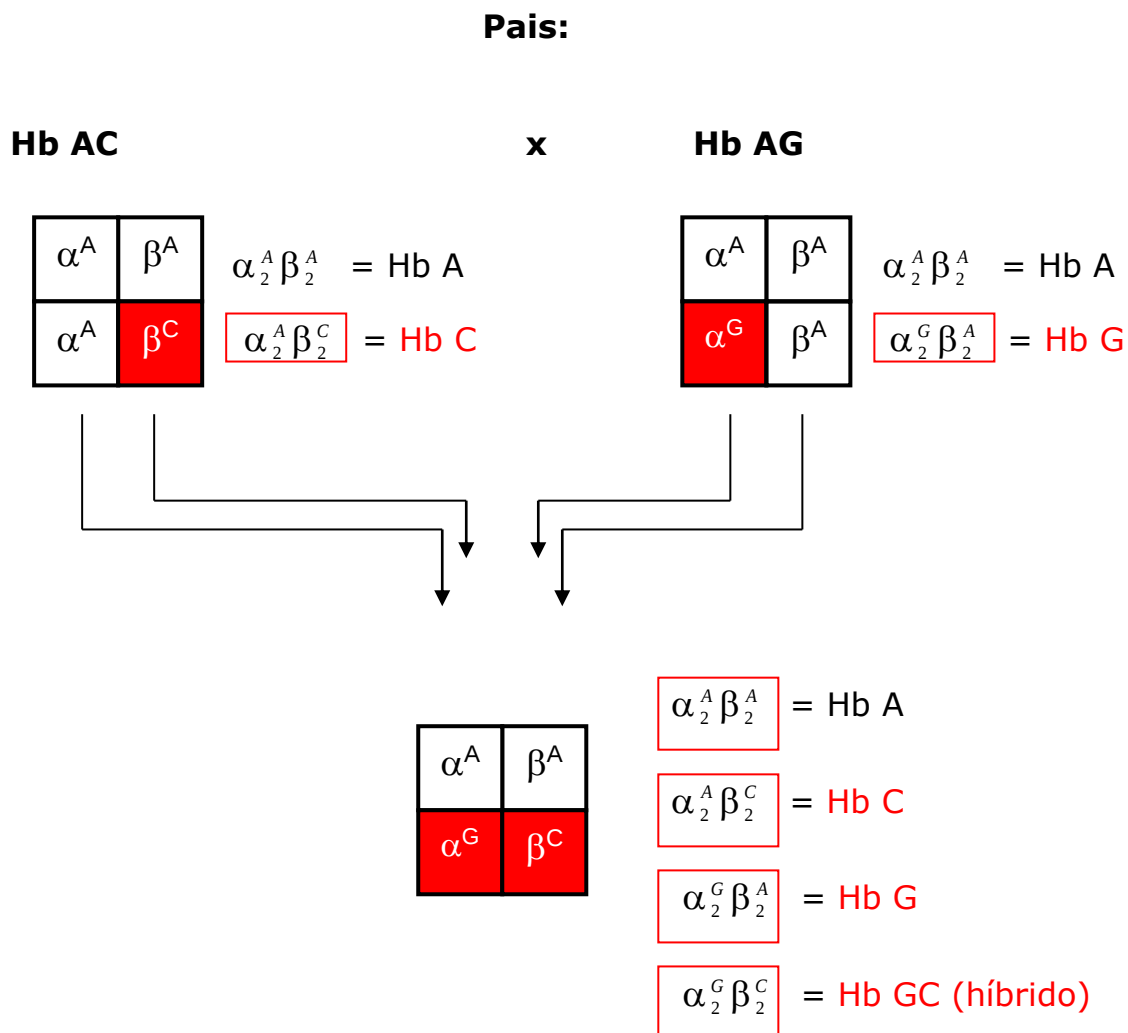
Hb AA – Padrão normal com Hb A (96,7%) Hb A₂ (3,3%).

Hb A* – Hb A₂ diminuída (0,6%) em paciente com ferropenia.

Hb AC – Heterozigose de Hb C, prevalente em 0,5% na população brasileira. A Hb C é uma mutante de globina

beta (β 6 Glu $\rightarrow$ Lis) e tem origem africana. O portador é assintomático.

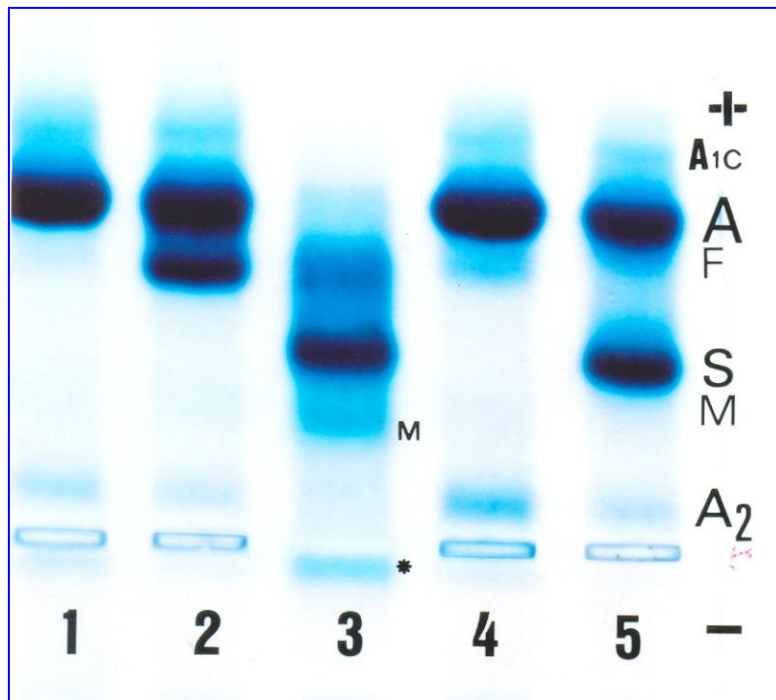
Hb AGC – Situação muito rara de dupla heterozigose. A Hb C, como se viu acima, é uma mutante de globina beta, enquanto a Hb G é mutante de alfa (α 68 Asn $\rightarrow$ Lis). É provável que os pais do paciente sejam portadores de Hb AC e Hb AG, e a herança ocorreu da seguinte forma:



O portador de Hb AGC é assintomático.

- Hb SC – Dupla heterozigose que caracteriza a doença falciforme SC. O paciente padece de anemia hemolítica moderada a grave. Prevalência no Brasil de 1:20.000.
- Hb SF – Nesse caso com a Hb Fetal elevada (22,5%) associada à Hb S (73,4%) e Hb A₂ (4,1%), com VCM e HCM diminuídos, trata-se da interação de Hb S com talassemia beta, ou Hb S/tal. beta. Prevalência na população brasileira 1:30.000. O paciente padece de anemia moderada a grave.
- Hb SS – Anemia falciforme, ou homozigose de Hb S. A anemia é quase sempre acentuada. A prevalência na população brasileira é de 1:10.000.
- Hb AS – Traço falciforme. O portador é assintomático e a prevalência na população brasileira é de 2,1%. Na Bahia a prevalência varia entre 5 a 10% devido ao predomínio da população negra, enquanto que em Santa Catarina a prevalência é de 0,5% devido à marcante colonização européia.

3. FAMÍLIA COM Hb S/TALASSEMIA BETA

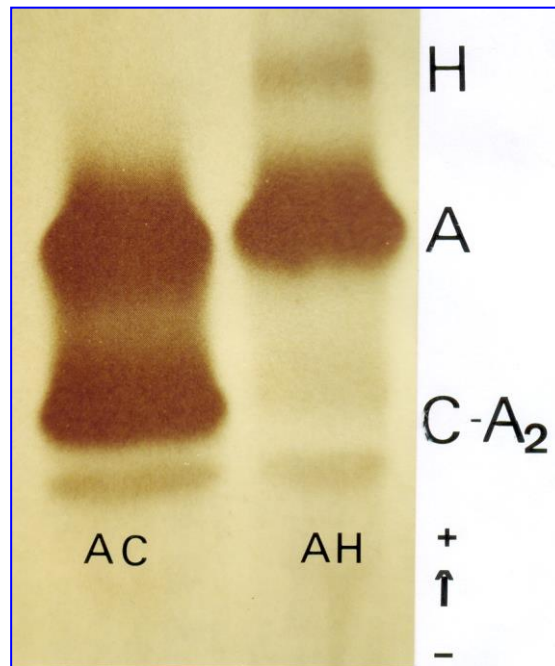


A interação entre Hb S e talassemia beta, ou Hb S/tal. beta, como mostra a análise de nº 3 na eletroforese, é caracterizada clinicamente como doença falciforme. O estudo eletroforético revela, quase sempre, o perfil de Hb SF, com concentração de Hb F (ou Fetal) entre 5 e 20%. Geralmente os pais são assintomáticos, como nesse caso; a análise nº 4 é o pai, com talassemia beta menor (Hb A₂: 5,3% e Hb Fetal: 3,1%, ambas elevadas) e a mãe (nº 5) é portadora de traço falcêmico. A análise nº 1 é um padrão normal para hemoglobina (Hb AA) enquanto que a de nº 2 é um padrão com Hb Fetal elevada, obtida de um recém-nascido (Hb AF).

No presente caso de Hb S/tal. beta (nº 3) é possível observar elevação de meta Hb S (identificada por M) e por globinas alfa livres (comuns na talassemia beta) e identificada por (*).

O desempenho qualitativo dessa eletroforese foi excelente e permitiu a identificação do grupo de hemoglobinas glicadas (A_{1a}, A_{1b}, A_{1c} e A_{1d}) identificadas como A_{1c}.

4. Hb H E TALASSEMIA ALFA

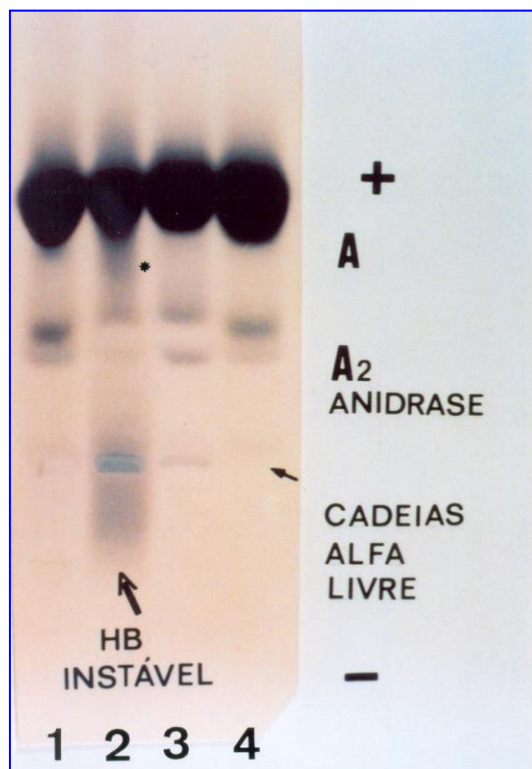


A talassemia alfa é a mais prevalente alteração genética da hemoglobina em todas as populações mundiais. Sob o ponto de vista clínico há quatro categorias de talassemia alfa: mínima, menor, intermédia e maior.

A caracterização laboratorial da talassemia alfa se faz pela pesquisa eletroforética da Hb H. O presente caso é de talassemia alfa mínima em que a concentração de Hb H é 2,5%, o eritrograma do paciente apresentava valores normais com discreta alteração na morfologia eritrocitária. No Brasil, a tal. alfa mínima tem prevalência de 20 a 30%. Há países no Sudeste Asiático em que a prevalência de talassemia alfa mínima chega a 70%. Nos países africanos a prevalência varia entre 10 e 50% e nos países europeus entre 5 e 20%.

Na presente eletroforese confrontamos a Hb AH (tal. alfa mínima) com a Hb AC. Observe que a Hb A₂ do paciente com Hb AH está diminuída – é um fato constante na talassemia alfa a diminuição de Hb A₂.

5. Hb INSTÁVEL (Hb KOLN)



- (1) Talassemia beta menor com a Hb A₂ aumentada (A₂ > 4%)
Eritrograma com microcitose e hipocromia (Hb: 13,3g/dL;
VCM: 68 fL; HCM: 26 pg)
- (2) Hb Instável em paciente do sexo feminino, 32 anos, branca.
Observar um rastro identificado por (*), além da visível fração
espalhada atrás do ponto de aplicação e que é composta por
cadeias livres de globinas alfa. Trata-se da Hb Instável
denominada por Hb Koln (mutação no resíduo 98 da globina
beta: Valina → Metionina).
O eritrograma evidenciou anemia moderada (Hb 9,8 g/dL),
VCM: 96 fL com macrocitose e policromasia devido à
reticulocitose de 33%; hipocromia (HCM: 24 pg); corpos de
Heinz em 70% dos eritrócitos e metaemoglobina aumentada
(5,5%). Observar que a Hb A₂ do paciente com Hb Koln
apresenta-se em posição diferente aos das amostras (1) e (4).

É importante destacar que o hemolisado para eletroforese da hemoglobina Instável foi feito com a saponina a 1%, por isso foi possível visualizar as cadeias alfa livres.

- (3) Sangue do paciente com Hb Instável. O hemolisado foi feito com clorofórmio que destrói as evidências da Hb Koln (*) e das cadeias alfa livre. Apenas a Hb A₂ conserva a posição deslocada em relação à Hb A₂ das amostras (1) e (4).
- (4) Amostra de hemoglobina normal – Hb AA

6. HEMOGLOBINA INSTÁVEL POLIMERIZADA



- (1) Hb AA – hemoglobinas normais.

Obs.: Hb A₁ é a forma antiga de designar a Hb A.

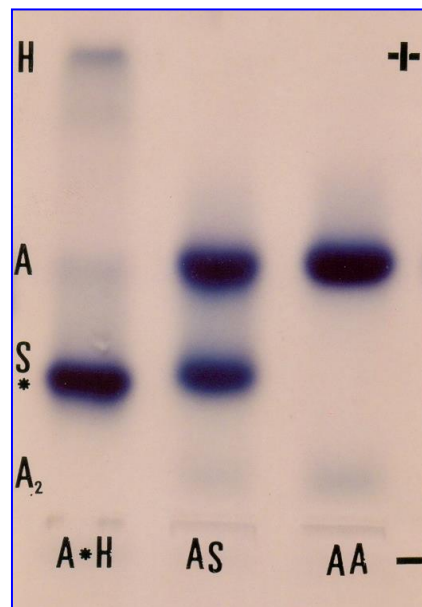
- (2) Hb A + Hb Instável – Paciente com 12 anos, masculino, branco, apresentou anemia moderada (Hb: 8,6 g/dL), morfologia eritrocitária com anisocitose e poiquilocitose, com destaque para “células mordidas”, reticulocitose de 17%, presença de corpos de Heinz em 50% dos eritrócitos, metaemoglobina elevada (6,7%) e bilirrubina total e indireta aumentadas.

As frações de hemoglobinas (a), (b) e (c) são polímeros da Hb Instável. É muito comum a Hb A₂ (d) das hemoglobinas instáveis apresentar-se discretamente acima da Hb A₂ normal.

- (3) Hb AF – Hb Fetal aumentada, com concentração de 5%, em paciente portador de talassemia beta menor.

(GV: $5 \times 10^6/\text{mm}^3$; Hb: 10,3 g/dL; Ht: 37%; VCM: 74 fL; HCM: 20,6 pg; RDW: 18)

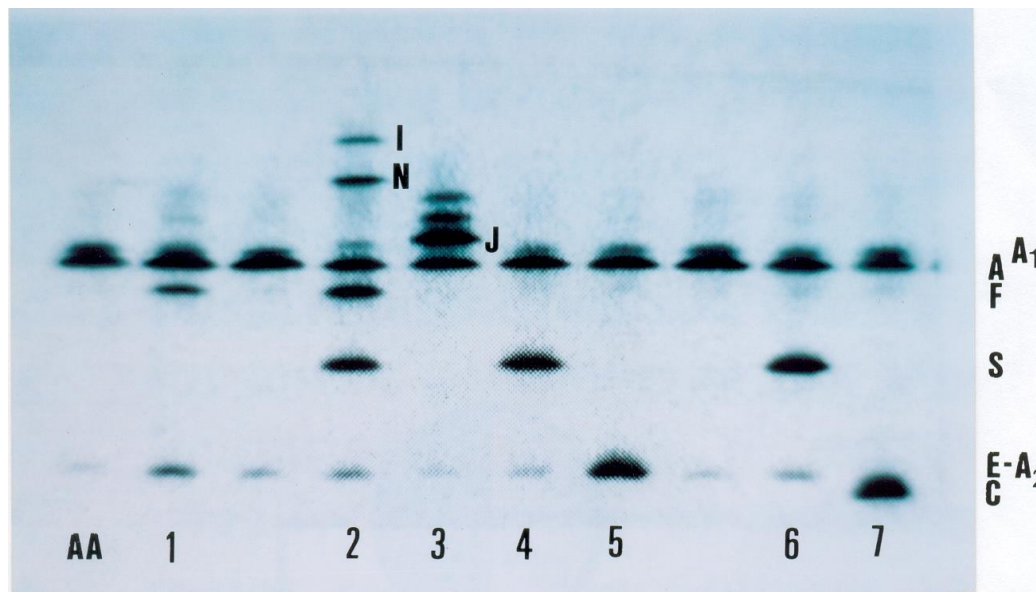
7. Hb KORLE-BU ASSOCIADA ÀS TALASSEMIA ALFA, BETA⁺ E DELTA



A Hb Korle-Bu é uma variante rara, mutante de globina beta (β 73 Asp $\rightarrow$ Asn), e de origem africana. Na eletroforese se posiciona discretamente mais lenta que a Hb S (primeira amostra à esquerda).

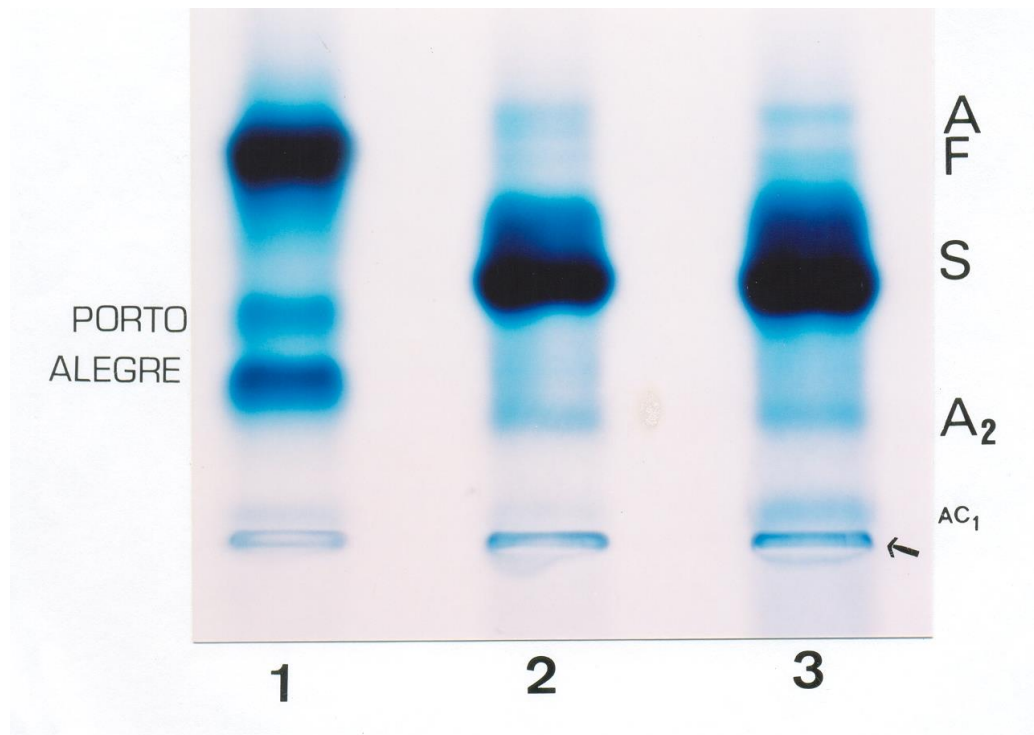
O presente caso pertencia a um paciente com anemia microcítica e hipocrômica (Hb: 10,1 g/dL, VCM: 72 fL e HCM: 20,2 pg). Todos os testes para Hb S foram negativos. Ao submetermos a amostra hemolisada com saponina a 1% observamos que a Hb anormal (Korle-Bu) era pouco mais lenta que a Hb S, apresentava Hb H (8,5%), a Hb A₂ estava ausente e havia cerca de 5,0% de Hb A. Na eletroforese se trata da primeira análise à esquerda e identificada por Hb A*H; o * foi colocado antes da análise molecular que revelou ser Hb Korle-Bu. Um dos pais era heterozigoto para Hb Korle-Bu e Hb H (Hb A/ Korle-Bu/ tal. alfa) e outro tinha β^+/δ^0 talassemia menor. As outras duas análises (Hb AS e Hb AA) foram colocadas na eletroforese como padrões de avaliação.

8. ELETROFORESE DE FOCALIZAÇÃO ISOELÉTRICA PARA HEMOGLOBINAS



Esta eletroforese pode ser feita em gel de agarose ou poliacrilamida. Mistura-se a um desses géis um composto químico conhecido por anfolina e que é capaz de dispor a composição desses géis em faixas específicas de pH variáveis entre pH 1 a pH 14. Ao aplicar amostras de hemoglobinas nesses géis, à medida que a hemoglobina A, S, Fetal, C, I, etc, se desloca, encontra seu ponto isoelétrico idêntico ao do pH da faixa, e assim ocorre a precipitação da hemoglobina (focalização). Observe nesta foto a nítida separação das hemoglobinas A, F, S, C, E, A₂, I, N, J e A_{1c}. A amostra identificada pelo número 1 é de um caso de talassemia beta menor com elevações de Hb F e Hb A₂; a amostra nº 2 é um padrão com Hb A, F, S, I e N; a de nº 3 é de Hb AJ e duas outras variantes não identificadas; a de nº 4 e nº 6 são de Hb AS (traço falciforme); a de nº 5 é Hb AE e a de nº 7 é Hb AC.

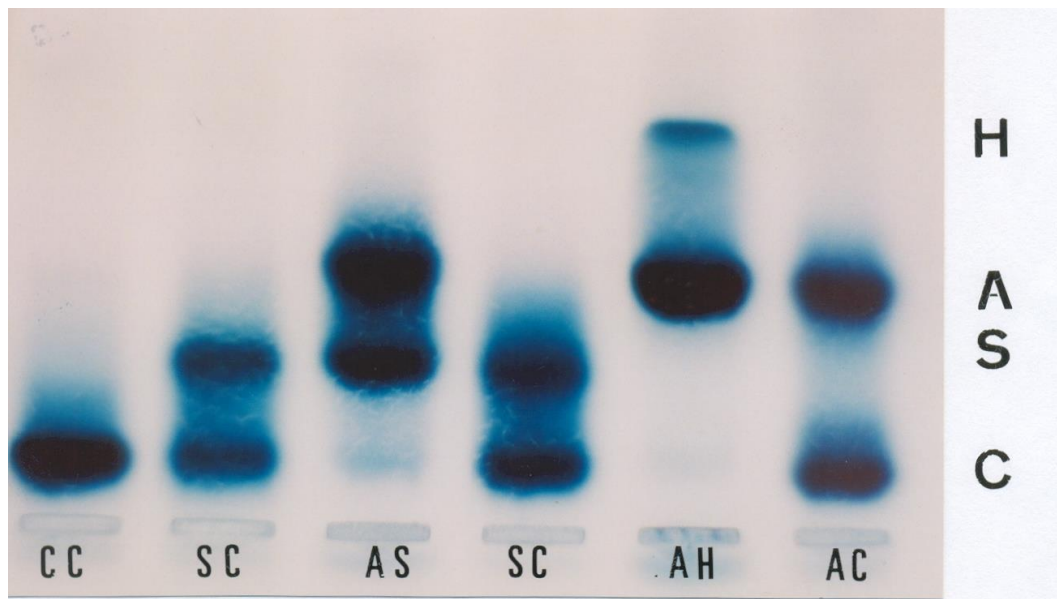
9. Hb PORTO ALEGRE (Beta 9 Serina → Cisteína)



A mutação que deu origem à Hb Porto Alegre é capaz de formar dois ou mais polímeros desta variante à medida que o hemolisado se torna envelhecido.

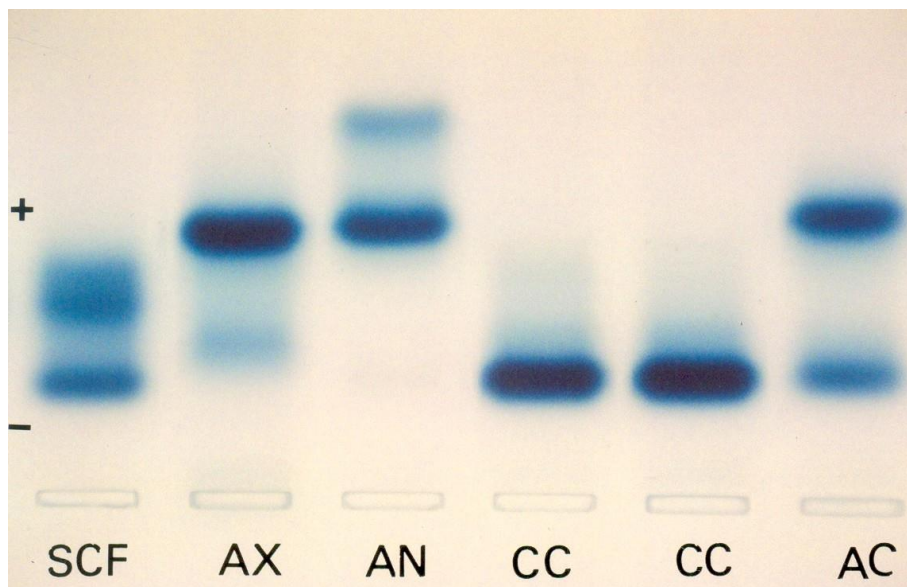
Observe na aplicação 1 que a Hb Porto Alegre tem duas frações (polímeros), uma na posição próxima da Hb C (mais concentrada) e outra na posição similar de Hb S. É um caso de heterozigose, pois está associada à Hb A. As aplicações 2 e 3 são amostras de um paciente com anemia falciforme (Hb SS) com discreta concentração de Hb A – resquício de uma transfusão de sangue – e traços de Hb Fetal.

10. DOENÇA DE Hb H E OUTRAS VARIANTES COMUNS



A doença de Hb H se caracteriza quando três ou quatro genes de globina alfa estão com suas sínteses diminuídas em relação à globina beta. Algumas vezes três genes alfa podem ter bloqueio total de síntese ou os quatro genes alfa podem ter sínteses parciais de globina alfa. Além de anemia com graus moderado a grave observável no eritrograma, as eletroforeses de hemoglobinas em pH alcalino ou pH neutro permitem a identificação da Hb H. O presente caso em eletroforese alcalina em gel de agarose mostra Hb H com concentração de 12%; trata-se de um paciente com a doença de Hb H (Hb: 9,6 g/dL; VCM: 67 fL; HCM: 19 pg). As outras variantes são Hb CC (homozigose), Hb SC (doença falciforme), Hb AS (traço falciforme) e Hb AC (heterozigose).

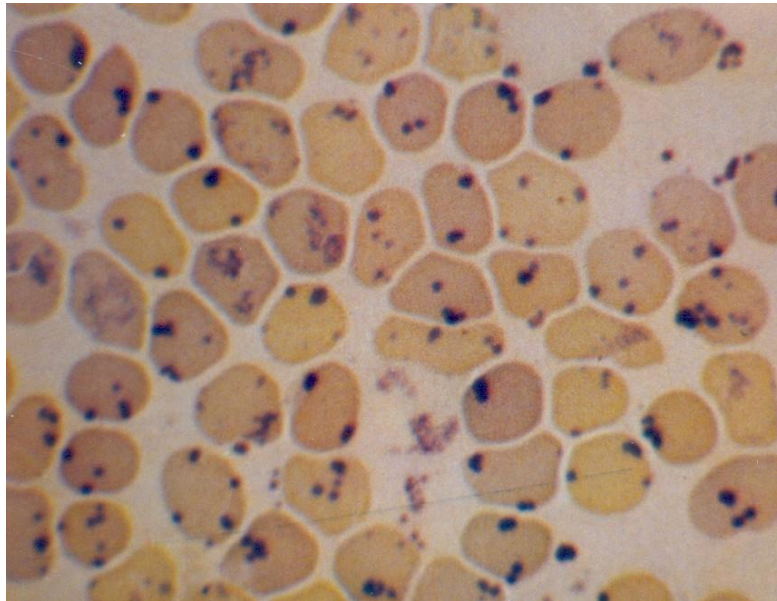
11. HB INSTÁVEL: SANTA ANNA (BETA 88 LEU - PRO) - ELETROFORESE



A eletroforese em agarose alcalina mostra da esquerda para a direita as seguintes hemoglobinopatias:

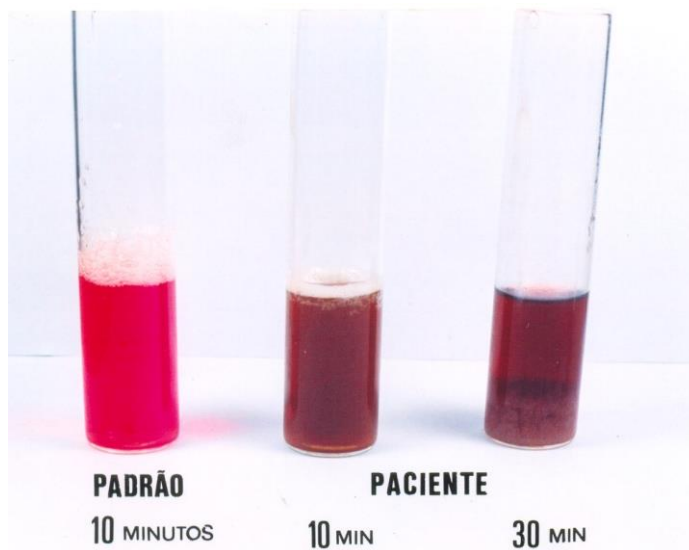
- a) Hb SCF – sangue de criança com quatro meses de idade portadora de doença falciforme por Hb SC e com Hb Fetal elevada devido à idade.
- b) Hb AX – A representação X é para a hemoglobina instável denominada por Santa Anna. A fração anormal é difusa e situa-se entre a Hb S e Hb C. O paciente apresentou na oportunidade anemia moderada (Hb 8,8 g/dL, VCM: 78 fL e HCM: 26 pg), presença de corpos de Heinz (próxima foto, nº 12) e teste de instabilidade térmica positiva (foto nº 13).
- c) Hb AN – A Hb N é uma variante de globina beta (95 Lis-Glu) que migra mais rápido que a Hb A e não é patológica.
- d) Hb CC – Homozigose da Hb CC, com discreta anemia microcítica e hipocrômica (Hb: 10,7 g/dL; VCM: 68 fL e HCM: 24 pg).
- e) Hb CC – idem
- f) Hb AC – Heterozigoto da Hb C (AC) sem consequência clínica.

12. HB INSTÁVEL: SANTA ANNA (BETA 88 LEU – PRO) – CORPOS DE HEINZ



A mutação do aminoácido leucina por prolina ocorre na região interna da molécula de hemoglobina, justamente onde há os contatos químicos entre as globinas alfa e beta. Com a mutação esses contatos ficam fracos, a molécula se desestabiliza e ocorre a precipitação da globina beta mutante. Os precipitados da globina beta mutante dentro dos eritrócitos formam agregados protéicos que se coram e são conhecidos por corpos de Heinz.

13. HB INSTÁVEL: SANTA ANNA (BETA 88 LEU - PRO) - PRECIPITAÇÃO



O teste de precipitação da Hb Instável é feito à temperatura de 50°C por 60 minutos. A Hb Santa Anna precipitou aos 10 minutos – comparar com o padrão – e a globina beta se sedimentou no fundo do tubo aos 30 minutos. Este é o teste de instabilidade térmica para hemoglobinas instáveis.

CAPÍTULO 7: DOENÇA FALCIFORME

Co-autor: Flávio Augusto Naoum

Fenótipos, genótipos e haplótipos

A doença causada pelas células falciformes se caracteriza por um conjunto de sinais e sintomas provocados pela deformação de milhões de eritrócitos com hemoglobina S (Hb S) induzidos pela desoxigenação. Esses eritrócitos com Hb S quando oxigenados (oxi-Hb S) se apresentam morfológicamente normais ou discóides no sangue; eventualmente podem ser observados alguns eritrócitos afoiçados ou falcizados (figura 7.1). Entretanto, há situações em que o processo de falcização é muito intenso devido à elevada concentração de Hb S desoxigenada (desoxi-Hb S), conforme mostra a figura 7.2.

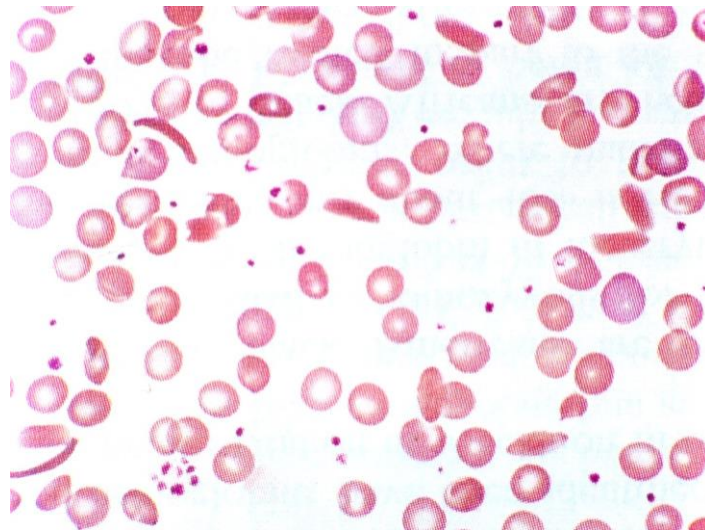


Figura 7.1 – Esfregaço de sangue periférico de paciente com anemia falciforme controlada, mostrando maior número de eritrócitos discóides em relação aos falcizados.

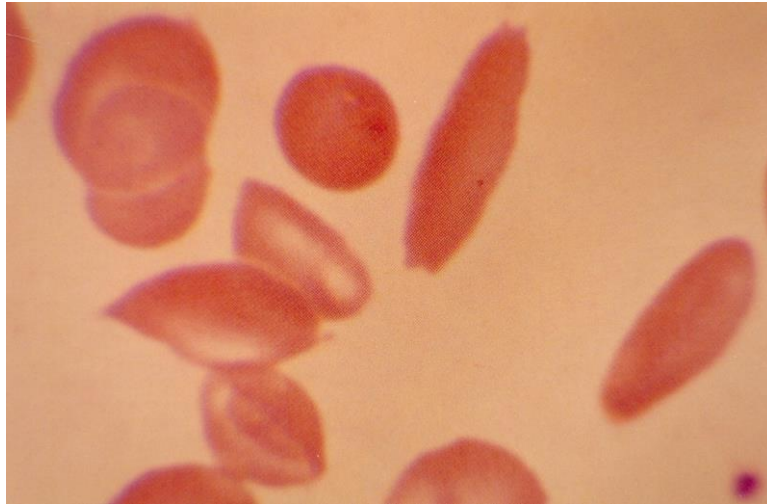


Figura 7.2 – Esfregaço de sangue periférico de paciente com anemia falciforme, coletado durante crise dolorosa, mostrando vários eritrócitos falcizados e em vias de falcização.

O primeiro relato a respeito da doença das células falciformes data de 1910, quando J.B. Herrick publicou um artigo científico na revista americana **Arquivo de Medicina Interna** sobre a presença de eritrócitos com a forma de foice em um paciente negro com anemia grave, icterícia e fortes dores nas articulações. A partir desse artigo outras publicações de casos semelhantes foram divulgadas, inclusive identificando a origem hereditária das células falciformes. Entretanto, todas essas comunicações destacavam apenas a diversidade clínica da doença com relação à gravidade e ao desenvolvimento da patologia.

Todavia, todos os trabalhos descritos até 1949 apresentavam a doença das células falciformes pelas características visíveis do processo anêmico específico, associado à presença de células falcizadas no esfregaço de sangue periférico e com notável prevalência entre negros ou descendentes africanos. Essa associação de características muito semelhantes fornecia o **fenótipo** de uma doença que era causada pelas células falciformes, e por isso essa patologia hematológica passou a ser conhecida por **doença das células falciformes**. Não obstante, ainda

continuava sem explicação convincente a grande diversidade clínica e hematológica entre os doentes falcêmicos. No ano de 1949 Linus Pauling juntamente com seus colegas de laboratório conseguiram separar por meio de eletroforese a hemoglobina anormal que causava a falcização eritrocitária, que foi denominada por "sickle hemoglobin" (ou hemoglobina falcizante). Para facilitar a divulgação científica desta hemoglobina anormal tomou-se por referência a primeira letra da palavra "sickle", surgindo então a **Hb S**.

O processo eletroforético foi de grande importância para o entendimento clínico, genético e hematológico dos doentes falcêmicos, pois sua aplicação permitiu explicar que a diversidade clínica e hematológica estava relacionada com a concentração da Hb S, bem como sua associação com outras hemoglobinas. Assim foram identificadas várias situações da doença em que a concentração da Hb S era variável. Hb S com concentrações próximas de 95-98% foi geneticamente caracterizada por Hb SS (homozigose da Hb S) e a doença foi especificamente denominada por **anemia falciforme**. Outros pacientes que, além de células falciformes continham também eritrócitos microcíticos e hipocrômicos, apresentavam em suas eletroforeses a Hb S associada com Hb Fetal, ou Hb F, e por isso identificados como Hb SF, foram caracterizados como doentes da anemia micro-drepanocítica e atualmente são conhecidos por **Hb S / talassemia beta** ou **Hb S / β tal**. Com o passar do tempo, o aperfeiçoamento técnico da eletroforese permitiu a identificação de associações de Hb S com outras hemoglobinas variantes, e assim foram descritas as Hb SC, Hb SD e Hb SO Arábia; essas associações foram nominadas por **doenças falciformes SC, SD e SO Arábia**, respectivamente. Outras interações mais raras como são os casos da anemia falciforme associada à talassemia alfa pela presença de Hb S e Hb H conjuntamente, e entre Hb S e Hb Fetal elevada – caracterizada por persistência hereditária de Hb Fetal (PHHF), foram denominadas por **Hb SS / Talassemia alfa** e **Hb S / PHHF**. Finalmente, o caso mais comum é a presença concomitante da

Hb S e Hb A (**Hb AS**) no portador do **traço falcêmico**, ou heterozigoto falcêmico, clinicamente assintomático e com eritrograma normal, onde a concentração da Hb S é menor que a Hb A. Essas associações de Hb S com outras frações normais e anormais de hemoglobinas, inicialmente estabelecidas por eletroforeses de hemoglobinas, e confirmadas por estudos nos familiares desses pacientes caracterizaram os diferentes **genótipos** da doença das células falciformes (figura 7.3). Dessa forma, o conjunto dos resultados laboratoriais e sintomas clínicos permitiram diferenciar adequadamente os genótipos de Hb S (tabelas 7.1 e 7.2).

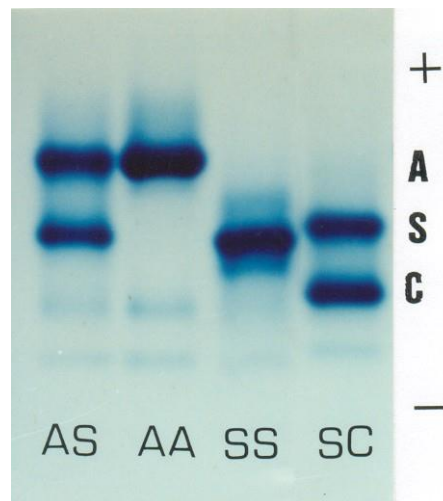


Figura 7.3 – Eletroforese de hemoglobinas em acetato de celulose, pH 8.6, mostrando da esquerda para a direita os genótipos Hb AS (heterozigoto de Hb S); Hb AA (padrão normal); Hb SS (homozigose de Hb S) e Hb SC (dupla heterozigose de Hb S e Hb C).

Tabela 7.1 - Genótipos de Hb S relacionados com alterações laboratoriais.

Genótipos	Hb (g/dl) Média (variação)	Ht (%) Média (variação)	VCM	Hb S %	Hb F %	Hb A %
SS (SS e SF)*	7,0 (5 - 9)	22 (18 - 30)	N	90 - 100	2 - 10	Zero
S/β ⁰ Tal. (SF)*	8,0 (7 - 10)	25 (20 - 35)	D	70 - 90	5 - 20	Zero
S/β ⁺ Tal. (SFA)	9,0 (8 - 11)	30 (25 - 35)	D	50 - 80	5 - 10	10 - 40
SD (SD)*	10 (8 - 12)	30 (25 - 35)	N	40 - 60	-	HbD: 40 - 60
SS/Tal α (SFH)*	8,0 (6 - 10)	30 (25 - 30)	D	80 - 90	10 - 20	HbH: 1 a 10%
SC (SC)*	11 (9 - 13)	30 (25 - 30)	N	40 - 60	-	HbC: 40 - 60
S/PHHF (SF)*	12 (10 - 14)	35 (30 - 40)	N	60 - 80	15 - 30	Zero
AS (**) (AS)*	13 (12 - 16)	40 (38 - 50)	N	30 - 40	-	60 - 70

(*) Principais frações de hemoglobinas identificadas por eletroforese alcalina.

(**) O genótipo da Hb AS **não** é considerado como doença das células falciformes. Foi incluído apenas para efeito de comparação. O portador de Hb AS é assintomático.

Tabela 7.2 - Alterações eritrocitárias mais comuns nos diferentes genótipos da doença das células falciformes.

Genótipo	Alterações eritrocitárias mais comuns
SS	Células falcizadas e em alvo. Hipocromia e policromasia. Eritroblastos. Corpos de Howell – Jolly. Reticulocitose (*). Corpos de Heinz (*).
S/β Tal (**)	Células falcizadas, microcitose, dacriócitos e células em alvo. Hipocromia e policromasia. Reticulocitose (*).
SS/ α Tal.	Anisocitose, microcitose, hipocromia e policromasia. Poucas células falcizadas.
SC	Anisocitose, poiquilocitose, células em alvo, cristais de Hb C, hipocromia. Poucas células falcizadas.
SD	Anisocitose, poiquilocitose, hipocromia. Poucas células falcizadas.
S/PHHF	Discreta anisocitose e anisocromasia. Poucas células falcizadas.
AS (***)	Normocitose e normocromia.

(*) Visíveis quando coradas com azul de crezil brilhante a 1%.

(**) Inclui os genótipos S/β⁰ Tal. (ou SF) e S/β⁺ Tal. (ou SFA).

(***) O genótipo AS **não** é considerado como doença falciforme. Foi incluído apenas para efeito de comparação.

Durante anos os casos clínicos de doenças das células falciformes foram classificados sem que fossem conhecidas as causas que deram origem à Hb S. Em 1956, Ingram estabeleceu quimicamente pela técnica de "fingerprinting" de peptídeos (figura 7.4) a diferença entre Hb A e Hb S. Constatou que se devia à mutação do sexto aminoácido da globina beta – o ácido glutâmico pela valina, assim representado (Hb S: $\beta 6 \text{ Glu} \rightarrow \text{Val}$).

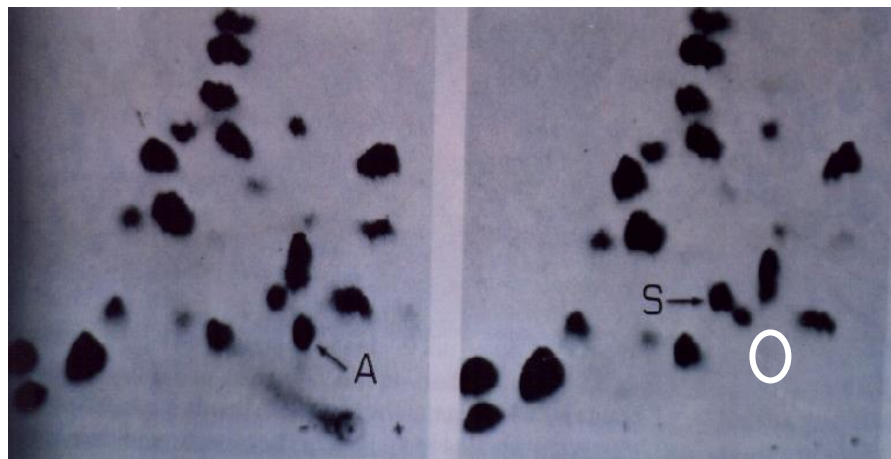


Figura 7.4 – Fingerprints (eletroforese associada à cromatografia em papel de filtro) de peptídeos obtidos após digestão de tripsina das globinas de Hb AA e Hb SS. A seta A indica o peptídeo normal que contém os onze primeiros aminoácidos da globina beta normal. A seta S mostra a nova posição deste mesmo peptídeo pertencente à Hb S. A mudança de posição se deve à mutação de ácido glutâmico por valina. O círculo branco representa a área em que o peptídeo normal deveria estar. A análise dos aminoácidos que compõem esse peptídeo revelou que o sexto aminoácido (ácido glutâmico) fora substituído por outro diferente (valina).

Em 1978 Kan e Dozy descreveram a sequência de bases nitrogenadas do gene da globina beta normal (Hb A) e da globina beta S

(Hb S). Em 1980 esses mesmos pesquisadores estudaram a evolução da Hb S por meio de técnicas de biologia molecular em vários doentes falcêmicos e concluíram que apesar da mutação da Hb S ser a mesma em todos eles, haviam diferenças entre as seqüências de bases nitrogenadas ao longo do agrupamento de genes da globina beta, sem que essas seqüências diversificadas influenciassem na síntese da hemoglobina S. Esses estudos realizados por fracionamento das seqüências de bases induzidas por enzimas extraídas geralmente de bactérias (endonucleases), permitiram estabelecer que a Hb S originou em pelo menos três regiões da África: Senegal, Benin e Bantu. Atualmente acredita-se que além destas três regiões, outras duas regiões, uma na África (Camarões) e outra na Ásia (Arábia e Índia) também sofreram o impacto da mutação da Hb S. Essa diferenciação antropológica identificada por técnicas de biologia molecular entre pessoas doentes com Hb S é conhecida por **haplótipos**. Até o presente são conhecidos os haplótipos Benin, Bantu, Senegal, Camarões, Árabe-Indiano e Atípicos. Os estudos antropológicos e hematológicos realizados com pacientes com anemia falciforme (Hb SS) e submetidos às análises de seus haplótipos, revelaram que os haplótipos Benin e Bantu estão relacionados com maior grau de anemia quando comparados com os haplótipos Senegal, Camarões e Árabe-Indiano (tabela 7.3), provavelmente devido à persistência da Hb Fetal nesses três haplótipos.

Tabela 7.3 – Relação entre a gravidade da anemia falciforme (Hb SS) com os diferentes haplótipos de Hb S.

Haplótipos de Hb S	Hb total (g/dl)	Hb Fetal (%)	Gravidade Clínica
Bantu	5,0 – 8,5	5 – 7	++++
Benin	7,0 – 8,5	5 – 7	+++
Senegal	8,0 – 9,0	8 – 10	++
Camarões	8,0 – 9,0	5 – 7	++
Árabe-Indiano	~ 9	15 – 20	+
Atípica	~ 8	5 – 7	variável

(++++) muito grave; (+++) grave; (++) moderado; (+) discreto

Principais evidências clínicas

A doença falciforme (DF) compreende um grupo de hemoglobinopatias com repercussão clínica significativa, caracterizada pela herança do gene falciforme em pelo menos um dos pais. Os principais genótipos que compõem a DF resultam da homozigose para o gene da Hb S ou **anemia falciforme**, e da dupla heterozigose composta entre o gene da Hb S e outras variantes como Hb C e Hb D (ex.: Hb SC e Hb SD), bem como na interação com a talassemia beta (ex.: Hb SF ou S/beta talassemia). Além disso, indivíduos com anemia falciforme podem ser portadores também de talassemia alfa ou de persistência hereditária da hemoglobina fetal (PHHF). O conhecimento dos diferentes genótipos da DF faz-se necessário em virtude de suas implicações no quadro clínico e prognóstico dos pacientes. O fenótipo expressado nessa doença também sofre influência dos diferentes haplótipos do gene falciforme e seus efeitos pleiotrópicos.

As manifestações clínicas decorrentes das síndromes falciformes são extremamente variáveis entre os pacientes e no mesmo paciente ao longo de sua vida. Anemia e fenômenos vaso-oclusivos são as complicações mais frequentes que determinam o quadro clínico desses pacientes, caracterizado basicamente por exacerbações ou "crises", entremeados por períodos relativamente assintomáticos, e complicações crônicas que podem acarretar disfunção orgânica grave e sequelas permanentes.

Os sintomas começam a aparecer ainda no primeiro ano de vida, com a diminuição da concentração de Hb Fetal nos eritrócitos. Na primeira década de vida, predominam complicações agudas como infecções, síndrome torácica aguda (STA), sequestro esplênico e acidente vascular cerebral (AVC). No paciente adulto grande parte das intercorrências clínicas decorre de lesões orgânicas crônicas, como insuficiência renal, doença pulmonar e insuficiência cardíaca, efeitos tardios de lesões cerebrovasculares prévias, disfunção hepática e das vias

biliares, sequelas motoras resultantes do comprometimento do sistema músculo-esquelético, entre outros. A crise dolorosa é a complicação mais comum, sua frequência e intensidade são altamente variáveis entre os pacientes, e podem ocorrer isoladamente ou acompanhando fatores predisponentes como infecção, desidratação, alteração brusca de temperatura, estresse físico ou emocional. Algumas manifestações clínicas são mais comuns em determinados genótipos, como a retinopatia nos pacientes com Hb SC e necrose avascular de cabeça de fêmur na anemia falciforme associada à talassemia alfa. Por essa razão a abordagem e acompanhamento do paciente com doença falciforme devem ser multidisciplinares envolvendo além do hematologista, pediatras, cardiologistas, cirurgiões, ortopedistas, oftalmologistas, obstetras, psiquiatras, e sub-especialidades dentro de cada uma destas disciplinas.

Além dos problemas médicos, a DF tem repercussão em vários aspectos da vida do paciente, como interação social, relações conjugais e familiares, educação e emprego. Nos países subdesenvolvidos somam-se às dificuldades já mencionadas, a precária assistência à saúde dispensada às populações carentes.

Nos países desenvolvidos, os indivíduos com DF sobrevivem em geral além da quinta década de vida, a mortalidade na infância é reduzida e a principal causa de óbito é a síndrome torácica aguda. No entanto, nas regiões que não implementaram medidas preventivas como triagem neonatal e administração precoce de penicilina profilática na infância, as infecções continuam liderando as causas de óbito.

O tratamento dos portadores de DF consiste basicamente em analgesia nas crises dolorosas, suporte transfusional esporadicamente ou regularmente (p.ex. AVC), indução da síntese de Hb Fetal com hidroxiuréia e butiratos, e medidas específicas para os diversos tipos de complicações que ocorrem nestes pacientes. O transplante de medula óssea embora sendo a única possibilidade de cura para esta doença, é um procedimento que envolve alta morbidade e mortalidade e sua indicação deve ser precoce e precisa.

Diagnóstico laboratorial da doença falciforme

As técnicas utilizadas para avaliar amostras de sangue encaminhadas ao laboratório com suspeitas de doença falciforme incluem testes que podem ser subdivididos em quatro grupos: a) **confirmatórios da presença de Hb S nos eritrócitos**: teste de falcização ou teste de solubilidade; b) **determinantes de genótipos** (AS, SS, SC, etc.): eletroforeses de hemoglobinas em meios alcalino e ácido, isoeletrofocalização, dosagem de Hb Fetal, e cromatografia líquida de alta pressão (HPLC); c) **determinantes de haplótipos** por meio de técnicas de biologia molecular; d) **monitoração**: hemograma, contagem de reticulócitos, morfologia eritrocitária, dosagens de: ferritina, bilirrubina, ácido úrico, fosfatase alcalina, desidrogenase láctica (LDH) e metaemoglobina, e pesquisas intracelulares de corpos de Heinz, Hb H e Hb Fetal.

Cada grupo de testes tem sua importância na informação de dados para fundamentar com segurança o diagnóstico completo da doença falciforme. Entretanto, para dimensionar sua importância no conjunto de informações, comentaremos cada um dos testes apresentados.

Teste de falcização: é um teste de avaliação qualitativa que determina a presença ou ausência de Hb S nos eritrócitos. Seu princípio se baseia na indução da falcização por meio da desoxigenação da hemoglobina por drogas redutoras num microambiente formado no espaço entre lâmina e lamínula. Vários fatores interferem na sensibilidade e reprodutibilidade do teste, entre os quais se destacam a proporção entre os volumes de sangue e da droga redutora, falha na vedação do microambiente, e tempo de reação. O teste de falcização é o menos indicado devido ao baixo grau de resolução, pois quando positivo não diferencia o estado de associação genética (genótipo) da Hb S (Hb SS, Hb SF, Hb SC, Hb AS, Hb SD). Além disso, há muitos casos de "falso negativo", ou seja, eritrócitos com Hb S que submetidos ao teste de falcização não falcizam.

Teste de solubilidade: esse teste é fundamentado no maior grau de insolubilidade da Hb S em comparação com a Hb A, em solução hipertônica contendo potente droga redutora (ditionito de sódio). Após misturar o sangue do paciente (suspeito de doença falciforme) com a solução hipertônica redutora, pode ocorrer ou não a turvação da mistura. A turvação indica insolubilidade da Hb S, enquanto que a transparência da mistura evidencia a ausência da Hb S. O teste tem baixa reprodutibilidade, podendo permanecer transparente mesmo na presença de Hb S. Também é um teste qualitativo, ou seja, a turvação ou insolubilidade da mistura não indica o tipo de associação da Hb S.

Eletroforese alcalina de hemoglobina: a eletroforese alcalina é assim denominada devido ao fato do tampão utilizado para esse fim ter pH variável entre 8 e 9. Nessa faixa de pH a mutação que deu origem à Hb S ($\beta 6 \text{ Glu} \rightarrow \text{Val}$) promoveu uma mudança de carga elétrica da molécula de Hb S, tornando-a menos negativa em relação à Hb A. Assim, quando amostras de sangue com diferentes genótipos são submetidas à eletroforese, a Hb S se move eletricamente de forma mais lenta que a Hb A (ver figura 6.5, capítulo 6 - Hemoglobinopatias). Há dois tipos de eletroforese alcalina de hemoglobina que são usados com maior frequência em laboratórios: o acetato de celulose e a agarose. Os dois testes apresentam excelentes padrões de qualidade técnica, permitindo a qualificação dos principais genótipos de doenças falciformes (tabela 7.1 e figura 7.4), entretanto, como se pode ver pela figura 6.5 do capítulo 6 (Hemoglobinopatias) e da relação de hemoglobinas variantes que migram na mesma posição da Hb S (tabela 6.3, capítulo 6 de Hemoglobinopatias), é necessário um meio de comprovação de que a hemoglobina variante em questão seja realmente a Hb S. O melhor meio para comprovar é a eletroforese ácida de hemoglobinas.

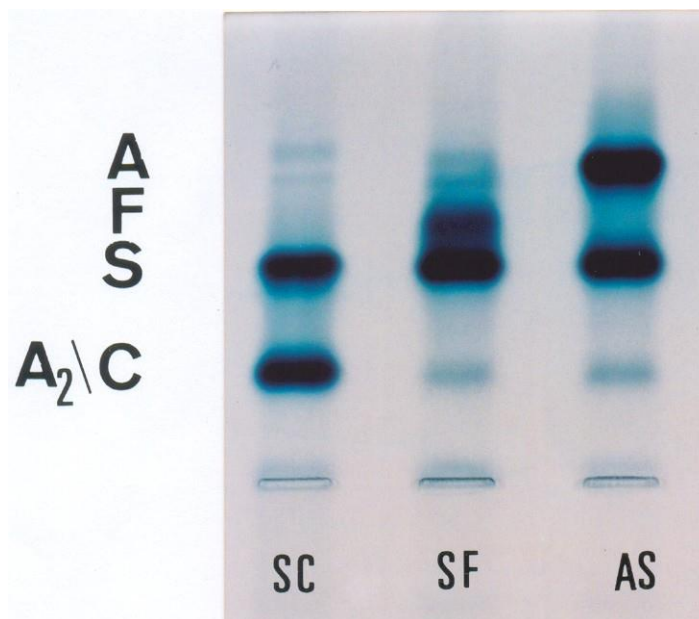


Figura 7.4 - Eletroforese alcalina de hemoglobinas em gel de agarose. Diferenciação da mobilidade eletroforética dos genótipos SC, SF e AS. Os traços de Hb A nos genótipos SC e SF se devem a sangue transfundido em ambos pacientes que cederam as amostras de sangue para análise.

Eletroforese ácida de hemoglobina: essa eletroforese é sempre realizada em gel de agarose tamponada em solução de citrato ou fosfato com pH variável entre 5 e 6, por isso é também conhecida por **agarose ácida**. Embora o princípio básico seja a movimentação da molécula de hemoglobina induzida por sua carga elétrica (ou ponto isoelétrico), na realidade um outro fator importante interfere na mobilidade elétrica – a eletroendosmose. A eletroendosmose é um fenômeno físico-químico que se deve à interação elétrica entre as proteínas da agarose com as diferentes moléculas de hemoglobinas. É por essa razão que a Hb Fetal se move com maior rapidez que a Hb A na eletroforese ácida (figura 7.5), uma vez que na eletroforese alcalina a Hb Fetal é mais lenta que a Hb A. Mas o grande mérito da eletroforese ácida é diferenciar a Hb S das outras 22 principais hemoglobinas variantes que migram na mesma posição quando submetidas à eletroforese alcalina. A tabela 6.3 (capítulo 6 - Hemoglobinopatias) lista essas hemoglobinas variantes em relação à suas

mobilidades na eletroforese em agarose ácida. Entre essas 22 hemoglobinas variantes que tem a mesma mobilidade da Hb S em eletroforese alcalina, a Hb D Los Angeles é a mais frequente em nossa população. Assim, é comum o uso da expressão "diferenciar a Hb S da Hb D". Dessa forma, a aplicação conjunta das eletroforeses alcalina e ácida de hemoglobinas tem importante função no estabelecimento dos diferentes genótipos de hemoglobinas, conforme mostra a figura 6.5 do capítulo 6.

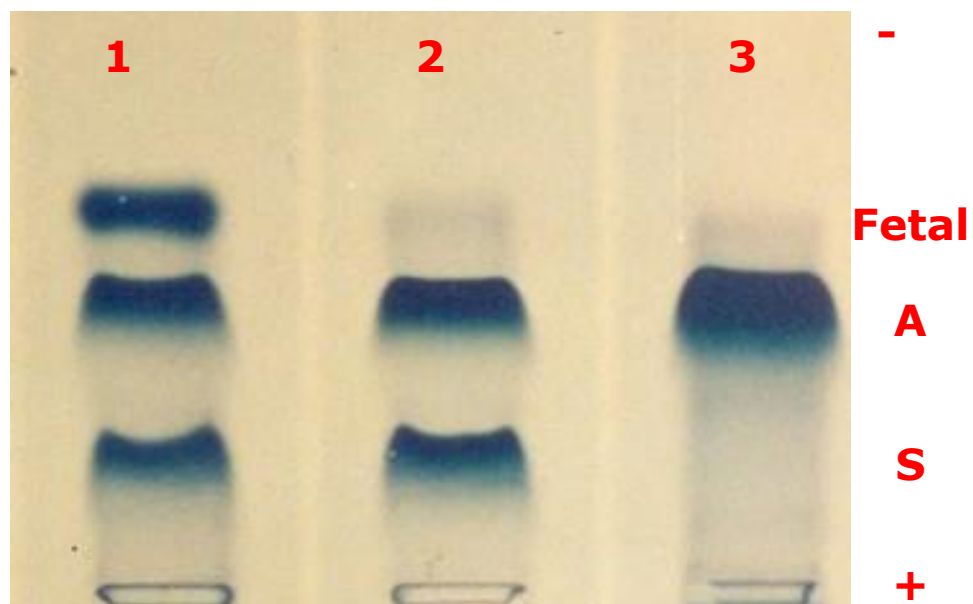


Figura 7.5 – Eletroforese ácida de hemoglobinas em gel de agarose. (1) Hb ASF em sangue de recém-nascido; (2) Hb AS; (3) Hb AA. Devido ao processo físico-químico de eletroendosse a Hb Fetal migra com maior rapidez que a Hb A.

Isoeletrofocalização: é também conhecida por eletroforese de focalização isoelétrica. Nesse tipo de eletroforese as proteínas são fracionadas de acordo com o seu pI ao longo de um gradiente de pH variável entre 5 e 14 que se forma durante a composição do gel. Este gradiente é estabelecido por um conjunto de anfólitos carregados isoeletricamente que permite identificar cerca de 80 tipos diferentes de

hemoglobinas variantes. A IEF apresenta algumas vantagens sobre outros procedimentos eletroforéticos e cromatográficos. As vantagens em relação às eletroforeses se devem ao fato das excelentes resoluções obtidas para separar hemoglobinas variantes cujo pI difere entre 0,02 a 0,001. As vantagens sobre os procedimentos cromatográficos se revelam pela quantidade de amostras requeridas – 10 a 50µl na IEF, enquanto na cromatografia líquida de alta pressão (ou HPLC) são necessários 200 a 300µl, e principalmente por permitir a análise de várias amostras por vez (20 a 100 amostras). São essas razões que influenciaram o uso IEF no "screening" para Hb S em sangue de recém-nascidos. O fracionamento das hemoglobinas A, F, S, D e C por IEF tem alto nível de resolução, permitindo inclusive a diferenciação entre as Hb S e Hb D (figura 7.6). Devido ao alto custo operacional, seu uso tem sido restrito à pesquisa laboratorial de frações variantes, e em "screening" de hemoglobinas – onde o elevado número de análises por eletroforese oferece uma relação custo-benefício compensadora.

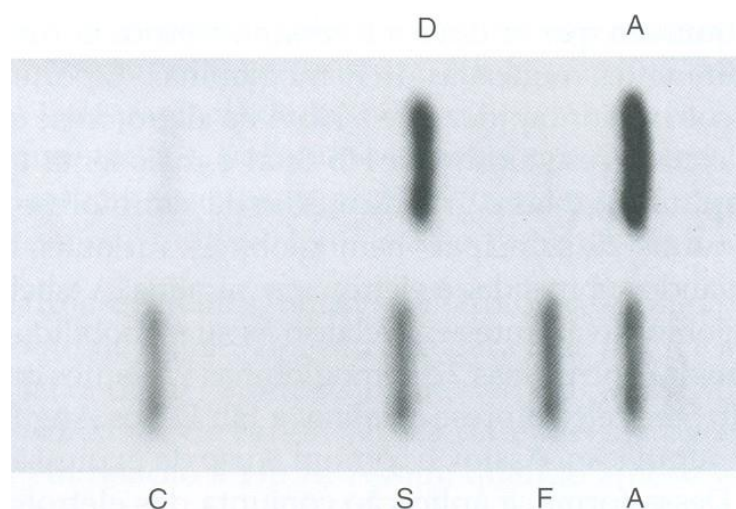


Figura 7.6 – Eletroforese de focalização isoeétrica (isoeletrofocalização) em gel de agarose. (1) "pool" de hemoglobinas A, F, S e C. (2) Hb AD. Por meio da isoeletrofocalização é possível obter fracionamentos de hemoglobinas com excelente nitidez, além de diferenciar as mobilidades das hemoglobinas S e D.

Dosagem de Hb Fetal: a determinação da concentração de Hb Fetal é fundamental em duas situações específicas: anemia falciforme e Hb S/talassemia beta, conforme mostra a tabela 7.1. Há uma relação direta entre concentração de Hb Fetal associada à Hb S, e o nível de hemoglobina total (g/dl) e o hematócrito. Da mesma forma, a elevação da concentração de Hb Fetal nos diferentes haplótipos de Hb S reduz a intensidade da gravidade clínica (tabela 7.3). A concentração de Hb Fetal é usualmente determinada por meio do teste bioquímico da resistência alcalina desta hemoglobina. Entretanto, há outras formas de avaliação quantitativa da Hb Fetal por metodologia imunológica e por densitometria do fracionamento obtido na eletroforese ácida de hemoglobina (figura 7.5). A metodologia imunológica tem boa sensibilidade e reprodutibilidade, porém o seu custo é alto. A densitometria da Hb Fetal dificilmente apresenta resultado coincidente com o obtido pela determinação bioquímica da resistência alcalina, isto se explica devido à densitometria ser um método essencialmente físico, enquanto a resistência alcalina é químico. A opção por um dos três métodos requer a padronização e obtenção dos valores de normalidade (média e desvio padrão).

Cromatografia líquida de alta pressão (HPLC): é um processo de troca catiônica onde moléculas com cargas positivas são adsorvidas em uma fase estacionária da coluna cromatográfica, seguida por suas eluições induzidas pela passagem de um líquido (fase móvel) com altas concentrações de cátions. O eluato é detectado opticamente e quantificado computando a área do gráfico correspondente à fração eluída. A automação da HPLC promove esse processo com grande eficiência e precisão, permitindo a quantificação de hemoglobinas A, A₂ e Fetal, bem como de hemoglobinas variantes. Assim, as hemoglobinas A, A₂, Fetal, S, C, O Arábia, D Los Angeles, e G Filadélfia podem ser separadas uma das outras. Entretanto, seu uso deve ser sempre monitorado por eletroforeses alcalina e ácida, uma vez que há

sobreposição de frações, como são os casos da Hb Lepore e Hb Korle-Bu que sobrepõe à Hb A₂. Na HPLC a Hb A₂ pode estar falsamente elevada na presença de Hb S.

Biologia molecular: o agrupamento de genes da globina beta no cromossomo 11 humano é uma das regiões polimórficas mais bem estudada por técnicas de biologia molecular. A utilização de diferentes enzimas de restrição permite a ruptura de ligações entre determinadas sequências de bases nitrogenadas, fato que determinou a qualificação dos cinco haplótipos. Muitos estudos têm sido realizados com o objetivo de relacionar esses haplótipos com a diversidade clínica que se verifica entre pacientes com anemia falciforme (tabela 7.3). Por outro lado, a biologia molecular tem sido usada para a identificação pré-natal de anemia falciforme por meio da enzima Mst II que fragmenta o DNA da globina β^S diferentemente da fragmentação do DNA da globina β^A . Esses fragmentos submetidos à eletroforese de DNA em gel de agarose permitem a separação do fragmento do DNA da globina β^S (com 1,35 Kb) do DNA da globina β^A (com 1,15 Kb). Uma outra aplicação da biologia molecular é usada na diferenciação da Hb S de outras hemoglobinas variantes que migram eletroforeticamente em posição similar à da Hb S, como são os casos da Hb D Los Angeles e Hb Korle-Bu, entre outras. Nesses casos, o DNA extraído é amplificado e submetido à ação da digestão enzimática com diferentes enzimas de restrição. O material resultante da digestão é submetido à eletroforese em gel de agarose ou poliacrilamida que permite, após a revelação das bandas, a identificação da Hb variante.

O hemograma: é uma análise que contempla diversas provas efetuadas, com a finalidade de avaliar quantitativa e qualitativamente os componentes celulares do sangue. Os itens avaliados incluem: contagem de eritrócitos, concentração da hemoglobina total, hematócrito, índices hematimétricos, leucócitos totais, contagem diferencial de leucócitos,

plaquetas, e análises morfológicas de eritrócitos, leucócitos e plaquetas. A importância do hemograma nas doenças das células falciformes se destaca sob dois aspectos: no monitoramento hematológico do paciente e no auxílio do diagnóstico diferencial entre a anemia falciforme e a interação Hb S/talassemia. Assim, os índices VCM (volume corpuscular médio) e HCM (hemoglobina corpuscular média) tem grande importância na diferenciação entre Hb SS e Hb S/talassemia, conforme mostra a tabela 7.4.

Tabela 7.4 – Diferenciação dos principais genótipos de Hb S relacionados aos valores de hemoglobina (Hb g/dl), volume corpuscular médio (VCM), reticulócitos e Hb Fetal.

Doença	Genótipo	Hb (g/dl)	VCM (fl)	Reticulócitos (%)	Hb Fetal (%)
Anemia Falciforme	β^S / β^S $\alpha\alpha / \alpha\alpha$	5 – 9	85 – 110	10 – 20	2 – 10
Hb S/tal α^*	β^S / β^S α^- / α^-	6 – 10	70 – 80	5 – 10	2 – 20
Hb SC	β^S / β^C $\alpha\alpha / \alpha\alpha$	9 – 13	75 – 85	5 – 10	1 – 5
Hb S/tal β^0	β^S / β^0 $\alpha\alpha / \alpha\alpha$	7 – 10	60 – 70	5 – 15	5 – 20
Hb S/tal β^+ **	β^S / β^+ $\alpha\alpha / \alpha\alpha$	9 – 11	60 – 70	5 – 10	5 – 10

* - Deleção de dois genes alfa

** - Em eletroforese identificam-se as frações de Hb A, F e S; a Hb S tem concentração maior que a Hb A.

Morfologia eritrocitária: é quase sempre muito diversificada pela presença de células falciformes, em alvo, dacriócitos, esquisócitos,

eritroblastos, policromasia, corpos de Howell-Jolly, pontilhados basófilos, micróцитos e macróцитos, principalmente.

Contagem de reticulócitos: a reticulocitose é comum nas doenças das células falciformes (tabela 7.4), e tem importância como marcador biológico do grau da eritropoiese. A pesquisa de corpos de Heinz na lâmina em que se avalia a contagem de reticulócito fornece subjetivamente o grau de oxidação da Hb S. Da mesma forma, utilizando a técnica da contagem de reticulócitos, é possível pesquisar a presença de precipitados intra-eritrocitários de Hb H para estabelecer a interação do genótipo de Hb S com talassemia alfa.

Ferritina: é a mais importante proteína de reserva de ferro. É encontrada em todas as células, especialmente naquelas envolvidas na síntese de compostos férricos, no metabolismo e na reserva de ferro. A dosagem de ferritina é o mais fiel indicador da quantidade de ferro armazenada no organismo. Na carência de ferro, a ferritina diminui antes das alterações dos níveis de ferro sérico e das alterações da morfologia eritrocitária. Sua concentração está elevada em politransfundidos, nas anemias hemolíticas e megaloblásticas, e nas lesões hepáticas. Por fazer parte do grupo de proteínas da fase aguda, a ferritina se eleva em respostas às infecções, traumatismos e inflamações agudas. Muitos doentes falciformes são submetidos a constante reposição de concentrado de eritrócitos, fato que caracteriza o "regime" de politransfusão. Os eritrócitos transfundidos aumentam a sobrecarga de ferro e, assim, a dosagem de ferritina se apresenta como sensível marcador dessa situação.

Bilirrubina: é o principal produto do metabolismo do grupo heme. Cerca de 70% da bilirrubina são provenientes da destruição de eritrócitos velhos, 15% provém de fontes hepáticas, e 15% se deve à destruição de eritrócitos defeituosos na medula óssea. Assim, no caso das doenças das células falciformes a excessiva quantidade de eritrócitos defeituosos induz

sua destruição precoce e, conseqüentemente, eleva a concentração de bilirrubina indireta para valores acima de 5mg/dl.

Ácido úrico: é o maior produto do catabolismo das purinas. Diversos fatores como dieta, predisposição genética, sexo, idade, peso, medicamentos, uso de álcool, e associação com outras patologias como *diabetes mellitus* e distúrbios lipídicos podem alterar os valores séricos e desencadear o desequilíbrio entre a absorção e a excreção de ácido úrico. A hiperuricemia ocorre quando a concentração de ácido úrico ultrapassa os valores de referência. Entre as várias causas que aumenta o ácido úrico no sangue destacam-se as anemias hemolíticas devido à reutilização de ácidos nucléicos provenientes da degradação da globina motivada pela precoce destruição dos eritrócitos, fato comum nas doenças das células falciformes. Portanto, nesses casos, a elevação do nível de ácido úrico é consequência da hemólise.

Fosfatase alcalina: é uma enzima presente em praticamente todos os tecidos do organismo, e em especial nas membranas das células dos túbulos renais, ossos, placenta, trato intestinal e fígado. Assim, a fosfatase alcalina encontrada no soro é resultante da presença de diferentes isoenzimas provenientes de diferentes órgãos, porém com predomínio das frações ósseas e hepáticas. Na prática clínica, a grande utilidade está na investigação de doenças hepatobiliares e doenças ósseas que cursam com aumento da atividade osteoblástica. Na anemia falciforme é frequente a ocorrência de cálculos biliares (colelitíase) devido à bilirrubinemia desencadeada pelas crises de hemólise, situações que elevam a concentração sérica de fosfatase alcalina.

Desidrogenase láctica (LDH): é uma enzima intracelular que induz a oxidação reversa do lactato em piruvato. Está amplamente distribuída em todas as células do organismo, concentrando-se especialmente no miocárdio, rim, fígado, eritrócitos e músculos. A elevação da LDH está

relacionada em todas as situações em que ocorre grande destruição celular, como são os casos das anemias hemolíticas e megaloblástica, insuficiência cardíaca congestiva, doenças musculares, lesões hepáticas, e neoplasias, entre outros. Nas doenças falciformes associadas à crises de hemólises, a LDH apresenta-se com concentrações elevadas, fato que a caracteriza como sensível marcador biológico da destruição de eritrócitos.

Metaemoglobina: a constante oxidação da Hb S eleva o nível de metaemoglobina. Quando a concentração da Hb S é maior que 50% a metaemoglobinemia desencadeia a degradação da Hb S com formação de corpos de Heinz. Todo esse processo provoca lesões na estrutura da membrana do eritrócito falciforme, induzindo sua destruição pelos macrófagos. Assim, a dosagem de metaemoglobina nas doenças das células falciformes se apresenta como importante indicador biológico relacionado à oxidação da Hb S.

Pesquisas intracelulares de corpos de Heinz, Hb H e Hb Fetal: os corpos de Heinz são precipitados de globinas α ou β que se aderem à membrana do eritrócito sob a forma de estruturas circulares. Quando a proporção de eritrócitos com corpos de Heinz é maior que 1 para 1000 eritrócitos normais é indicativo de processos oxidativos da hemoglobina. Nas doenças das células falciformes é comum a presença elevada de corpos de Heinz em proporções variáveis entre 1:50 a 1:200. A pesquisa de Hb H intraeritrocitária é necessária quando se suspeita de talassemia alfa. A talassemia alfa de um gene afetado é comum na população brasileira, com prevalência entre 15 a 25%, e sua identificação se faz pela presença de traços de Hb H na eletroforese alcalina de hemoglobina em acetato de celulose e também por meio da precipitação intra-eritrocitária de Hb H com corante redox (azul de crezil brilhante ou violeta de metil). Por ser uma lesão em apenas um gene alfa, dos quatro existentes, é muito difícil estar associada com alterações hematológicas e clínicas. Por outro lado, quando a lesão envolve dois genes alfa é comum a anemia

microcítica e hipocrômica de grau leve. A prevalência da alteração de dois genes alfa afetados na população brasileira é variável em 3 a 5%. Assim, a interação entre anemia falciforme (Hb SS) e talassemia alfa com um ou dois genes alfa afetados é comum em nossa população. As alterações hematológicas na interação de Hb SS/talassemia alfa são menores quando comparadas com a anemia falciforme "pura" (Hb SS) conforme mostra a tabela 7.4. Tecnicamente as pesquisas intracelulares de corpos de Heinz e de Hb H obedecem o mesmo procedimento de incubação de sangue total com azul de crezil brilhante, cujas diferenças morfológicas podem ser apreciadas nas figuras 7.7 e 7.8.

A pesquisa intracelular de Hb Fetal se faz por meio da técnica de eluição ácida no esfregaço de sangue total, em que Hb A é retirada (ou eluída) dos eritrócitos, enquanto que a Hb Fetal permanece dentro da célula. Após contra-coloração com eritrosina, ou até mesmo com Giemsa, é possível determinar a forma de disposição dos eritrócitos contendo Hb Fetal. Quando não há Hb Fetal os eritrócitos apresentam-se desprovidos de hemoglobina. Quando a distribuição é heterogênea, ou seja, presença concomitante de eritrócitos corados (indicativo de Hb Fetal) e vazios (indicativo de Hb A eluída), é sugestivo de talassemia menor ou maior. Quando todos os eritrócitos apresentam-se corados homogeneamente se trata de persistência hereditária de Hb Fetal (PHHF). Há dois grupos específicos de genótipos de Hb S associados com Hb Fetal, quais sejam: Hb S / talassemia beta e Hb SS / PHHF. No primeiro grupo a associação é interativa entre o gene β^S e o gene β^{Tal} , com anemia microcítica e hipocrômica e anemia variável entre grave (Hb S/tal β^0) a moderada (Hb S/tal β^+), conforme mostram a tabela 7.1 e tabela 7.4. No segundo grupo situa-se a associação entre a anemia falciforme com PHHF, onde a Hb Fetal elevada inibe o processo de polimerização da Hb S fato que favorece o desempenho fisiológico da oxigenação, diminuindo a intensidade da anemia, bem como das manifestações clínicas.

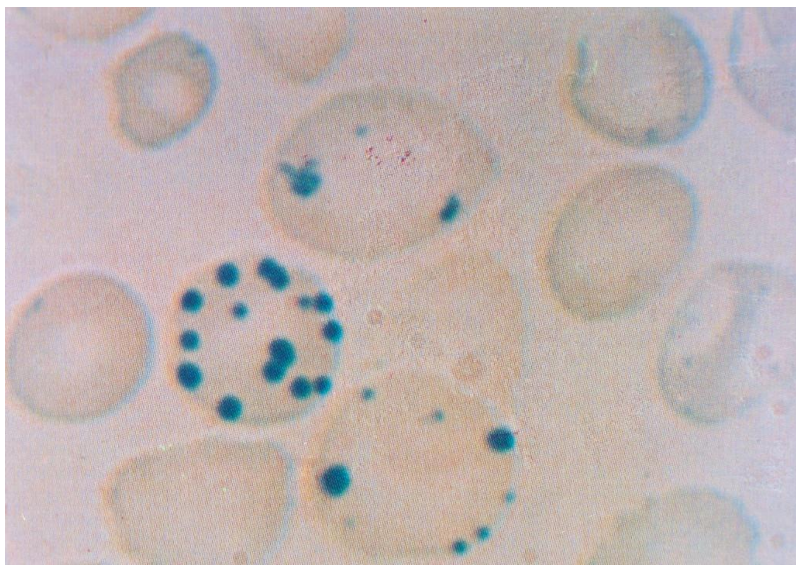


Figura 7.7 – Precipitados intra-eritrocitários de corpos de Heinz em pessoa com anemia falciforme.

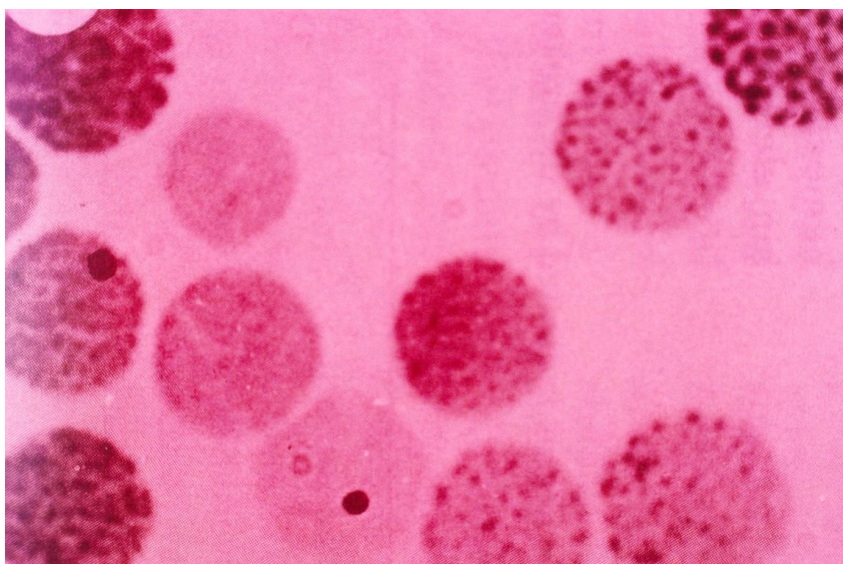


Figura 7.8 – Precipitados de Hb H em eritrócitos de pessoa com talassemia alfa.

Hb AS – Traço falciforme ou falcemia heterozigota

O traço falciforme caracteriza o portador assintomático, laboratorialmente representado pela associação das hemoglobinas A e S, ou Hb AS. A concentração da Hb S no traço falciforme é sempre **menor** que da Hb A, variando entre 30 e 40% (ver tabela 7.1 e figura 7.3). Eventualmente, quando associado com anemia ferropriva ou talassemia alfa, a concentração da Hb S pode se situar abaixo de 30%. Pelo fato da menor concentração da Hb S em relação à da Hb A, o portador heterozigoto não padece da doença e não apresenta alterações hematológicas.

Os processos vaso-oclusivos sob condições fisiológicas normais inexistem, e, portanto, não há mortalidade e nem morbidades seletivas. Geralmente detecta-se o portador de Hb AS em estudos populacionais e pré-natal, ou em análises de familiares com membros portadores do gene da Hb S. No Brasil a prevalência média de Hb AS é próxima de 2,0% na população total, entretanto se considerarmos somente pessoas de cor negra a prevalência média é por volta de 5%, com grandes diferenças regionais. Entre pessoas de cor branca a prevalência média de Hb AS é variável entre 1,0 e 1,3%, evidenciando a representativa miscigenação branco-negra da população brasileira.

Geneticamente a condição heterozigota se deve à herança do gene da globina β^S por parte de um dos pais, juntamente com gene da globina β^A proveniente do outro. Em nossa população as formas mais comuns de transmissão do gene β^S para o traço falciforme se devem aos seguintes genótipos dos pais, por ordem decrescente de frequência: AS x AA; AS x AS; SS x AA; SC x AA; S/ β Tal x AA.

A deficiência de G-6PD associada à Hb AS em geral não acrescenta morbidade às já porventura preexistentes, entretanto foram relatados casos com maior incidência de hematúria e embolia pulmonar, além de discreto grau de anemia associada à presença intraeritrocitária de corpos de Heinz.

A interação entre Hb AS com talassemia alfa de um ou dois genes afetados pode ser identificada pela presença de Hb H com concentrações variáveis entre 0,5 a 5%, além das hemoglobinas A₂, S e A. Nesses casos é comum a diminuição da concentração da Hb S (tabela 7.5). Hematologicamente, os valores hematimétricos se situam na faixa menor dos valores de normalidade, porém é comum a presença de discreto grau de aniso-poiquilocitose no esfregaço sanguíneo. A interação de Hb AS com a doença de Hb H é uma situação extremamente rara, que apresenta a concentração da Hb H variável entre 10 e 20%, a Hb S entre 15 e 20%, e a Hb A₂ visivelmente diminuída. Nesses casos a anemia é moderada a grave (Hb: 7 a 10 g/dl), com intensas alterações na morfologia eritrocitária, e precipitados de Hb H facilmente identificáveis após incubação do sangue em solução de azul crezil brilhante (figura 7.6). A tabela 7.5 resume as principais avaliações hematimétricas na interação entre Hb AS/talassemia alfa.

O diagnóstico laboratorial é feito por técnicas eletroforéticas em pH alcalino e pH ácido (figuras 6.5, 7.4 e 7.5), que associadas permitem a caracterização dos genótipos de S, e em especial da Hb AS. Com o uso de gradiente de pH apropriado, a eletroforese de focalização isoeletrica também identifica a Hb S em seus diversos genótipos. Outros testes que apenas detectam a presença de Hb S, sem identificar o seu genótipo (AS, SS, SC, etc.), são os testes de falcização e de solubilidade.

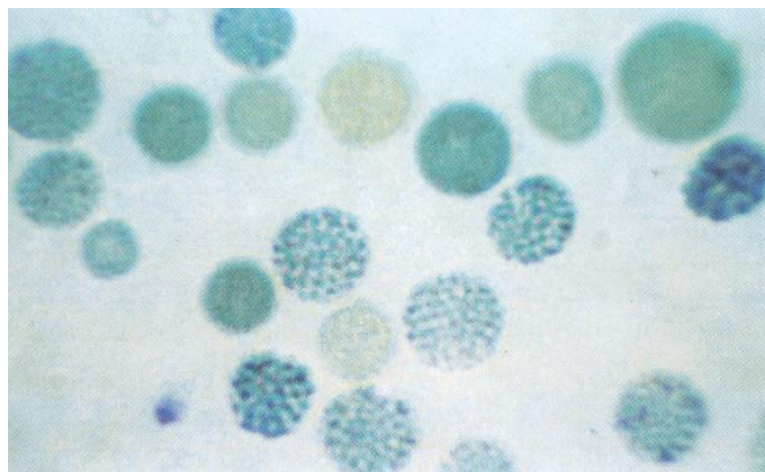


Figura 7.6 – Precipitados de Hb H na doença de Hb H, após incubação do sangue total misturado com azul de crezil brilhante a 37°C / 1 hora. Na associação da Hb AS com doença de Hb H é possível obter resultados similares ao desta figura.

Tabela 7.5 – Relação entre genótipos de talassemia associados à Hb AS (Hb AS/tal alfa) com as alterações hematimétricas.

Genótipo	Hb (g/dl)	VCM	%Hb S	% Hb H
AS; $\alpha\alpha / \alpha\alpha$	13 – 15	77 – 92	30 – 40	–
AS; $\alpha - / \alpha\alpha$	11 – 15	75 – 85	30 – 40	0,5 – 1,0
AS; $\alpha - / \alpha -$	11 – 13	70 – 75	20 – 30	2,0 – 5,0
AS; $\alpha - / - -$ (*)	7 – 10	50 – 60	15 – 20	10,0 – 20,0

(*) Doença de Hb H

Hb SS – Anemia falciforme

A anemia falciforme é o estado de homozigose da Hb S representado por Hb SS. Ao contrário dos portadores do traço falciforme (Hb AS), a história de pacientes com anemia falciforme revela, quase invariavelmente, por repetidos episódios dolorosos, geralmente do tipo vasculoclusivo, com ou sem efeitos mielodepressivos (deficiência temporária da medula óssea em produzir eritrócitos). Os sinais e sintomas são especialmente causados por anemia crônica, períodos de agravamento de anemia, dores nas juntas e nas extremidades de mãos e pés, dores abdominais, necrose asséptica da medula óssea, acidentes cerebrovasculares, infartos pulmonares, entre outros.

Os recém-nascidos com anemia falciforme geralmente não apresentam os problemas causados por essa hemoglobinopatia devido à alta concentração de Hb Fetal presente nos eritrócitos, durante os dois primeiros meses de vida. Entretanto, a gradual substituição da Hb Fetal ($\alpha_2 \gamma_2$) pela Hb S ($\alpha_2 \beta_2^S$), motivada pela redução genética da síntese de globinas γ ao mesmo tempo em que ocorre a indução genética da síntese de globinas β^S , faz com que a doença se expresse a partir do quarto mês de vida.

Os exames laboratoriais indicam anemia grave, com hemoglobina variável entre 5 e 9 g/dl, que associados à acentuada queda de hematócrito e contagem de eritrócitos resultam em índices normocíticos e normocrômicos, apesar da evidente aniso-poiquilocitose com presença de células falciformes, conforme mostram as tabelas 7.1 e 7.2. A leucocitose é moderada (12.000 a 17.000/mm³), frequentemente com desvio à esquerda com neutrófilos bastonetes. As plaquetas podem estar discretamente elevadas. O exame da medula óssea apresenta hiperplasia normoblástica e áreas de hematopoiese podem ser encontradas em regiões geralmente ocupadas por tecido adiposo (ou medula amarela). Os exames bioquímicos do sangue revelam alterações em vários parâmetros, conforme mostra a tabela 7.6.

Tabela 7.6 – Parâmetros bioquímicos em 74 pacientes com anemia falciforme do Instituto Estadual de Hematologia do Rio de Janeiro – HEMORIO.

Parâmetros	Valores obtidos	Média
Ferritina (µg %)	16,4 – 1000,0	223,07
Bilirrubina total (mg %)	0,4 – 8,8	2,65
Bilirrubina direta (mg %)	0,1 – 2,6	0,62
Bilirrubina indireta (mg %)	0,3 – 8,1	2,04
AST (UI/L)	14,0 – 129,0	45,37
ALT (UI/L)	6,0 – 85,0	25,14
Creatinina (mg %)	0,2 – 1,0	0,56

AST – Aspartato amino transferase (ou transaminase oxaloacética)

ALT – Alanina amino transferase (ou transaminase pirúvica)

Fonte: Marcos Kneip Fleury, 2000.

A eletroforese de hemoglobina apresenta concentrações de Hb S variáveis entre 90 e 100%, Hb Fetal: 2 a 10%, e Hb A₂: 2 a 4%. A Hb A está sempre ausente em pacientes com anemia falciforme **não transfundidos**, conforme mostra a figura 7.7.

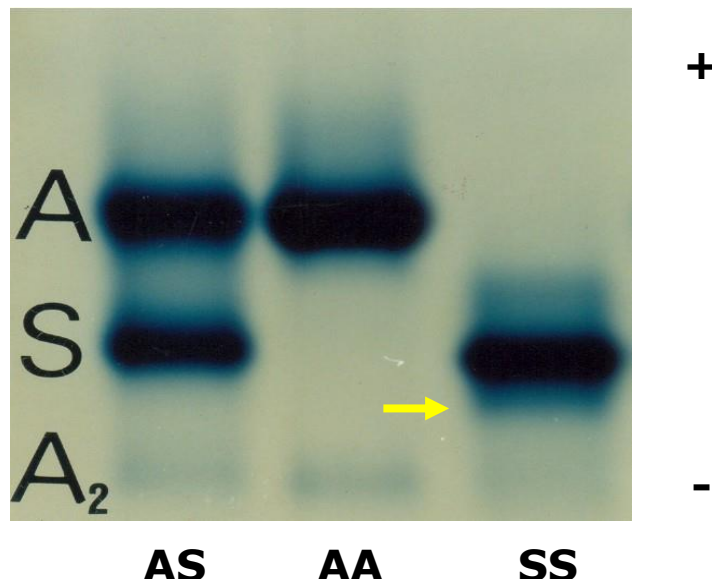


Figura 7.7 - Eletroforese alcalina de hemoglobina em acetato de celulose. (1) Hb AS; (2) Hb AA; (3) Hb SS com 5% de Hb Fetal. A seta indica fração de meta Hb S em paciente com anemia falciforme associada à deficiência de G6PD.

A Hb Fetal na anemia falciforme – Na anemia falciforme a concentração de Hb Fetal é geralmente variável entre 2 e 10%, mas pode ser maior que 10%, e em alguns casos pode ultrapassar 40%. Pesquisas realizadas em pacientes com anemia falciforme dos sexos masculino e feminino, revelaram que o nível médio de Hb Fetal é maior entre as mulheres. A concentração de Hb Fetal é determinada por fatores relacionados e não-relacionados com o agrupamento de genes da globina beta, fato evidenciado entre os diferentes haplótipos de Hb S obtidos de estudos realizados em pessoas com anemia falciforme (ver tabela 7.3). A análise dessa relação revela que a gravidade clínica da anemia falciforme é menor quando o nível de Hb Fetal está mais elevado. A relação entre os diferentes haplótipos de Hb S com a concentração de Hb Fetal parece estar relacionada com a persistência hereditária de Hb Fetal (PHHF) dos genes específicos para síntese da globina gama. No cromossomo 11 há dois genes gama que expressam globinas gamas diferentes – um deles com a síntese de alanina e outro com a síntese de glicina – e por isso

denominados por gene γ^A e gene γ^G . Nas pequenas concentrações de Hb Fetal presente em adultos com hemoglobinas normais, a relação γ^G / γ^A , tende a um valor próximo de 2:3. Nas colônias de células eritróides obtidas de sangue fetal a Hb Fetal tem maior proporção de γ^G , enquanto que em colônias com maior concentração de Hb A, o predomínio é de γ^A . A porcentagem de células F, ou seja, eritrócitos com Hb Fetal, está aumentada na anemia falciforme. Estudos realizados com amostras de sangue de pacientes com anemia falciforme, em comparação com Hb AA, revelaram que cerca de 55% dos eritrócitos falciformes continham Hb Fetal, enquanto que em portadores de Hb AA o valor médio foi de 3%. Foi demonstrado também que fatores genéticos ligados ao cromossomo X interferem na síntese de Hb Fetal, fato que explicaria a maior concentração de Hb Fetal entre as mulheres. A figura 7.7 mostra a eletroforese alcalina de um caso com Hb SS com 5% de Hb Fetal.

Hb SS / Talassemia alfa (Hb SH) – A talassemia alfa é uma alteração da síntese de globina alfa que pode ter origem genética ou adquirida. A causa hereditária da talassemia alfa está bem definida e se deve a defeitos no processo de síntese de globinas alfa, por lesão molecular de um, dois, três ou quatro genes alfa. A causa adquirida tem sido relatada em pacientes com doenças linfó e mieloproliferativas, cuja prevalência de talassemia alfa chega a atingir 60% entre esses doentes. Entretanto, pouco se sabe de que forma surge a talassemia alfa adquirida – se induzida por drogas quimioterápicas ou por alterações genéticas da célula tronco hematopoiética.

Entre pessoas negras, a talassemia alfa resulta geralmente da deleção de um ou dois genes alfa. A prevalência de talassemia alfa entre negros da América do Norte é de 30%, enquanto no Brasil é variável entre 20 e 25%. Assim, admite-se que a interação entre a anemia falciforme e talassemia alfa ocorra com alta frequência. Foi demonstrado em vários estudos descritos na literatura científica que a talassemia alfa representa um fator modulador dos parâmetros hematológicos, com

elevação da contagem de eritrócitos e redução dos índices hematimétricos: VCM (volume corpuscular médio), HCM (hemoglobina corpuscular média), e CHCM (concentração de hemoglobina corpuscular média). A redução do número de moléculas de Hb S no eritrócito diminui a formação de polímeros das moléculas de desoxi-HbS, e consequentemente se forma menos eritrócitos falciformes irreversíveis. Dessa forma, a interação entre Hb S/talassemia alfa parece ser benéfica à anemia falciforme, pois aumenta a sobrevivência do eritrócito falcêmico, diminui o grau de hemólise, e consequentemente torna a anemia menos grave, conforme mostra a tabela 7.7. Entretanto, na associação entre Hb S e doença de Hb H (lesão de três genes alfa) a anemia se torna grave. Nesses casos a concentração de Hb H associada à Hb S é variável entre 15 e 25% (figura 7.8).

Tabela 7.7 – Parâmetros hematológicos na interação entre anemia falciforme e talassemia alfa.

Genótipo	Tipo de Hb	Hb g/dl	VCM	Reticulócito
$\alpha\alpha \beta_2^S / \alpha\alpha \beta_2^S$	SS	5 – 9	85 – 110	10 – 20
$-\alpha \beta_2^S / \alpha\alpha \beta_2^S$	SH*	7 – 10	80 – 95	5 – 10
$-\alpha \beta_2^S / -\alpha \beta_2^S$	SH**	9 – 11	70 – 80	5 – 10
$-\alpha \beta_2^S / - - \beta_2^S$	SH***	5 – 8	60 – 70	> 20

* Lesão de um gene alfa; Hb H: 0,5 a 2% na eletroforese alcalina.

** Lesão de dois genes alfa; Hb H: 2 a 8% na eletroforese alcalina.

*** Lesão de três genes alfa ou Hb S/doença de Hb H; Hb H: 15 a 25% na eletroforese alcalina.

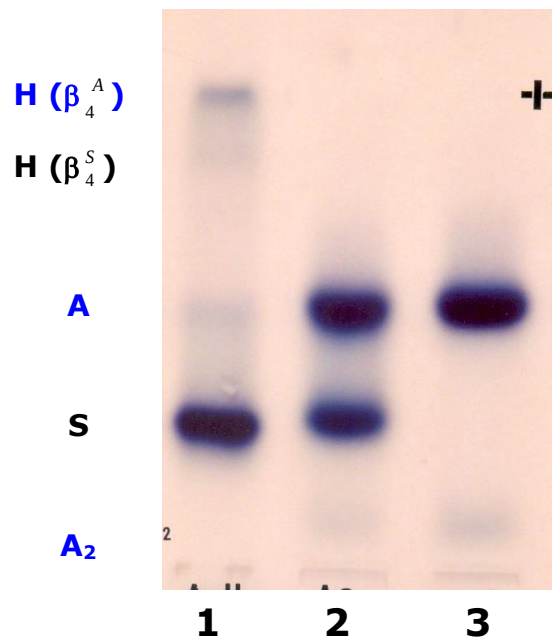


Figura 7.8 - Eletroforese alcalina de hemoglobina em acetato de celulose. (1): Hb SH obtida de paciente com anemia falciforme (transfundida, por isso a presença de Hb A) associada a talassemia alfa ($-\alpha\beta_2^S/-\beta_2^S$), observe a presença de duas frações de Hb H: uma formada por tetrâmeros de β^A e outra por tetrâmeros de β^S ; a concentração maior da Hb H por β_4^A em relação à diminuta concentração da Hb H por β_4^S se deve ao fato deste tetrâmero ser muito instável. (2): Hb AS. (3): Hb AA. Para visualizar a Hb H é necessário aplicar hemolisado feito com saponina a 1%.

Anemia falciforme e deficiência de G-6-PD – A coexistência da Hb SS com deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase (G-6-PD) é um fato presumível uma vez que a prevalência da deficiência dessa enzima entre a população negra é por volta de 9 a 15%. Embora a literatura científica se refira de forma genérica que a associação entre Hb SS/deficiência de G-6-PD parece não ter influência no número de eritrócitos falciformes irreversíveis (ou células densa), ou no nível de concentração da hemoglobina total, bem como na condição clínica do paciente, é importante destacar que há, pelo menos, cinco classes diferentes de

deficiência de G-6-PD (tabela 7.8). A classe 1 é muito rara, entretanto as classes 2 e 3 são as mais importantes sob o ponto de vista clínico, pois causam crises de hemólises quando o portador é exposto a drogas oxidantes. No Brasil, a deficiência de G-6-PD mais comum é a da classe 3, com os **tipos africanos** prevalecendo em 87% dos casos descritos, seguida da classe 2 onde os **tipos mediterrâneos** atingem 13%.

Tabela 7.8 – Classificação da deficiência de G-6-PD em cinco classes.

Classes	Características
1	Variantes deficientes associadas à anemia hemolítica crônica. Ex.: variante de G-6-PD New York
2	Variantes com deficiência acentuada da atividade da enzima G-6-PD, com menos de 10% de atividade normal. Ex.: variantes mediterrâneas.
3	Variantes com deficiência moderada da atividade da enzima G-6-PD, com 10 a 60% da atividade normal. Ex.: variantes africanas.
4	Variantes com deficiência discreta da atividade da enzima G-6-PD, com 60 a 95% da atividade normal.
5	Variantes com atividade aumentada da enzima G-6-PD.

Sob o ponto de vista fisiológico a associação da Hb SS com deficiência de G-6-PD é desastrosa à molécula de hemoglobina. A deficiência de G-6-PD é um fator indutor da desnaturação da hemoglobina, enquanto que a Hb S apresenta alto grau de oxidação espontânea. A associação desses dois defeitos num mesmo eritrócito certamente desencadeia com maior intensidade a desnaturação oxidativa da Hb S, especialmente se exposto a fatores indutores como são os casos de drogas e poluentes ambientais oxidativos. Diante desses fatos ocorre maior consumo das enzimas antioxidantes, alterando as sínteses e as suas concentrações. Assim, os mecanismos redutores da oxidação e das lesões celulares provocadas pelos radicais livres causam a diminuição das atividades de glutatíon peroxidase e catalase, aumenta o nível de

superóxido dismutase (SOD) e diminui a concentração de vitamina E no plasma e na membrana eritrocitária.

A avaliação citológica de corpos de Heinz nos pacientes com anemia falciforme é sempre um excelente marcador biológico dos processos oxidativos. Na associação entre Hb SS e deficiência de G-6-PD a precipitação intraeritrocitária de corpos de Heinz é muito mais expressiva. Outro indicador da deficiência de G-6-PD em pacientes com anemia falciforme é a elevada concentração de metaemoglobina, que pode ser quantificada bioquimicamente ou visualizada durante o processo eletroforético da Hb SS – notadamente após 48 horas da coleta do sangue (figura 7.7).

Investigação laboratorial – O diagnóstico laboratorial da anemia falciforme inclui o hemograma completo, as eletroforeses de hemoglobina em tampões alcalino e ácido, dosagens de Hb Fetal e metaemoglobina, contagem de reticulócitos e pesquisas intraeritocitárias de Hb H e corpos de Heinz. O hemograma é fundamental para avaliar quantitativamente o grau de anemia, além de fornecer os índices hematimétricos de VCM e HCM que são importantes parâmetros para diferenciar os genótipos da anemia falciforme (SS e SF) e da talassemia beta (SF), conforme mostram as tabelas 7.1 e 7.4. A eletroforese de hemoglobina em pH alcalino identifica a fração anormal com suspeita de ser a Hb S, pois nesta mesma região eletroforética se posiciona a Hb D. Assim, os genótipos SS, SD e DD apresentam com as mesmas características eletroforéticas, conforme mostra a figura 6.5 do capítulo 6. Para identificar cada um desses genótipos é necessário recorrer à eletroforese de hemoglobinas em gel de agarose com pH ácido, que separa com excelente resolução esses genótipos. É importante destacar ainda que a eletroforese alcalina quer seja em gel de agarose ou em acetato de celulose, permite a separação da Hb Fetal e sua quantificação densitométrica, fato que auxilia o diagnóstico dos diferentes genótipos das doenças falciformes. Por outro lado, a eletroforese alcalina em acetato de celulose é fundamental na

identificação da Hb H e da metaemoglobina (que apresenta cor marrom ou de castanha) quando associadas à anemia falciforme. A dosagem de Hb Fetal é importante não apenas para caracterizar o genótipo da doença falciforme, mas principalmente para o entendimento da evolução clínica do paciente, onde o maior nível de Hb Fetal representa melhor prognóstico da doença. Por outro lado, a dosagem da metaemoglobina indica o grau de oxidação da Hb S, pois as concentrações elevadas estão relacionadas com processos fisiopatológicos mais deletérios ao eritrócito falciforme, bem como podem indicar a associação da Hb SS com deficiência de G-6-PD; nestes casos se faz necessário a dosagem enzimática desta enzima. A contagem de reticulócitos estabelece importantes parâmetros sobre o processo hemolítico decorrente da anemia falciforme, bem como a resposta da reposição eritrocitária – ou eritropoiese. A pesquisa intraeritrocitária de Hb H (figura 7.6) é um excelente método de confirmação da talassemia alfa. A pesquisa intraeritrocitária de corpos de Heinz representa importante informação sobre o desencadeamento de processos oxidativos da Hb S, bem como a suspeita da associação entre Hb SS e deficiência de G-6-PD.

Finalmente, é sempre importante enfatizar que para a correta conclusão do diagnóstico laboratorial da Hb SS ou da Hb SS/Talassemia alfa é necessário que se faça a análise de hemoglobinas no sangue dos pais. No caso da Hb SS, os genótipos mais comuns dos pais são: AS x AS; AS x SS; AS x SC; AS x S/Talassemia Beta. Quando a Hb SS está associada à talassemia alfa um dos pais deve apresentar a Hb H, por exemplo: AS x ASH; ASH x SC, etc.

Interação Hb S/Talassemia beta

A interação entre Hb S e talassemia beta foi descrita pela primeira vez por Ezio Silvestroni e Ida Bianco em 1954. Esses pesquisadores observaram que alguns dos seus pacientes apresentavam anemia de graus moderado a grave, com a presença concomitante de células falciformes e microcíticas, e por essa razão a anemia foi denominada de **micro-drepanocitose**. Eletroforeticamente a interação Hb S/Talassemia Beta apresenta dois padrões genotípicos, um com as hemoglobinas SF (Hb SF) e outro com Hb SFA; em ambos os casos a concentração da Hb S é sempre maior que as outras hemoglobinas (ver tabela 7.1).

A ocorrência da interação Hb S/Talassemia Beta em nosso país se deve ao alto grau de miscigenação entre as etnias que participaram da formação do povo brasileiro. Embora o gene da globina β^S seja muito prevalente entre populações do continente africano, outros povos também apresentam altas prevalências notadamente na Arábia Saudita, Emirados Árabes, Caribe, sul da Itália, e em negros das Américas do Norte e do Sul. Por outro lado, o gene da globina β anormal que induz a falha na síntese da globina beta – ou gene β talassêmico – apresenta expressiva prevalência entre os povos de países banhados pelo mar Mediterrâneo, com destaques para Itália, Turquia, Grécia, Chipre, Itália, Líbano e países do norte da África. Ao longo do tempo ocorreu a expansão do gene β talassêmico para Portugal, Espanha, leste europeu e Ásia. No Brasil a prevalência da Hb S/Talassemia Beta é de um caso para 25 mil pessoas, e conforme dados obtidos junto à Organização Mundial da Saúde estima-se que nascem anualmente no Brasil cerca de 600 crianças com esse genótipo.

A Hb S/Talassemia Beta pode ser diferenciada laboratorialmente por meio de eletroforeses alcalina e ácida em dois genótipos: SF e SFA. No genótipo SF há completa ausência da Hb A, com concentrações variáveis de Hb A₂ entre 2 e 6% (figura 7.9).

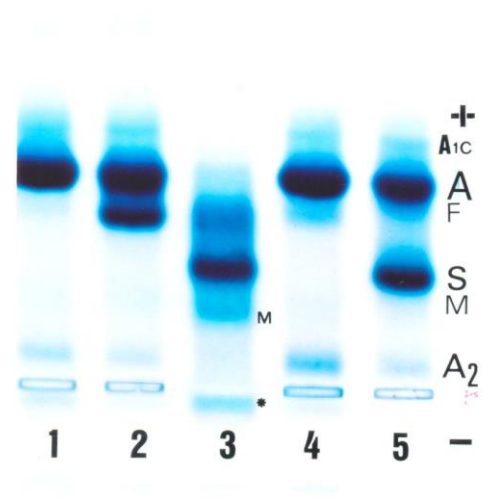
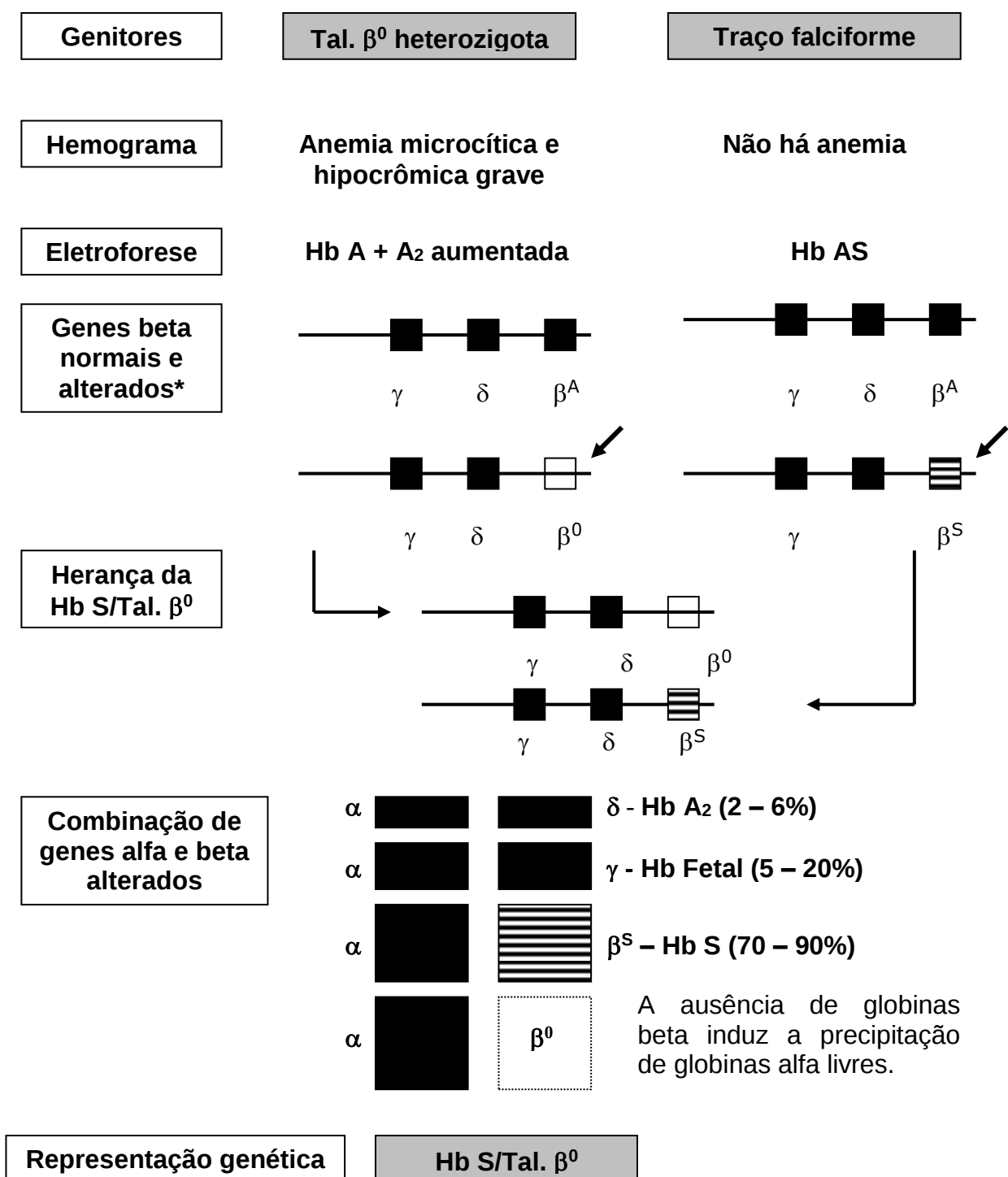


Figura 7.9 - Eletroforese alcalina de hemoglobinas em gel de agarose. (1) Hb AA – padrão normal; (2) Hb AF na talassemia beta maior após transfusão de concentrado de hemácias; (3) Hb S/Tal. β^0 ou Hb SF com excesso de metaemoglobina S e globinas alfa livres atrás do local da aplicação; (4) Pai do caso 3 – talassemia beta menor com Hb A₂ e Hb Fetal aumentadas; (5) Mãe do caso 3 com Hb AS.

Esse genótipo se deve à total deficiência de síntese de globina beta normal ou β^A , sendo por isso denominado por talassemia β^0 que associado a Hb S se torna **Hb S /Tal. β^0** . Na talassemia β^0 há elevada expressão do gene gama que induz o aumento da síntese da Hb Fetal quando há interação com a Hb S. A situação mais freqüente de herança desse genótipo ocorre quando um dos pais é portador heterozigoto de talassemia beta menor, ou Tal. β^0 heterozigoto, e o outro é portador de Hb AS (figura 7.10). Pela representação esquemática dessa figura é possível entender a ausência eletroforética da Hb A, e as concentrações elevadas das Hb S e Hb Fetal. Entretanto um fato relevante mostrado no esquema se refere às globinas alfa "livres" que por **não terem** globinas β^A para se combinarem, precipitam nos eritrócitos e formam corpos de Heinz. Os corpos de Heinz são retirados por macrófagos do sistema retículo endotelial, causando lesões nos eritrócitos – principal causa da formação de micrócitos esquisócitos e, conseqüentemente da microcitose. As

globinas alfa "livres" são facilmente identificadas em eletroforese alcalina de hemoglobina em agarose ou acetato de celulose, que após coloração com negro de amido são visíveis atrás do ponto de aplicação das amostras (figura 7.9). Destaque importante dessa figura se deve à presença de meta Hb S induzida pelo alto grau de oxidação da Hb S e também, em parte causada pela oxidação das globinas alfa "livres". Como já foi exposto anteriormente, o alto grau de oxidação da hemoglobina inviabiliza a sua integridade molecular, tornando-a instável estruturalmente – principal causa da precipitação de globinas β^S sob forma de corpos de Heinz.



* - Nesta representação só foram incluídos os genes do cromossomo 11 (γ , δ e β). Os quatro genes alfa não foram incluídos, admitindo-os com sínteses normais.

Figura 7.10 – Representação esquemática da herança e das conseqüências fisiopatológicas da Hb S/Tal. β^0 .

O genótipo SFA se deve à associação entre a talassemia β^+ - caso em que o gene da globina β^A está parcialmente afetado para sintetizar Hb A - e Hb S, configurando a representação genética de **Hb S/Tal. β^+** . Nesse caso a forma mais comum da expressão dessas alterações se caracteriza pela maior concentração da Hb S em relação à Hb A (figura 7.11). Eventualmente a Hb Fetal pode estar elevada. Pelo fato de ocorrer alguma síntese de Hb A, que pode representar entre 10 e 40% do total da hemoglobina (ver tabela 7.1), as conseqüências fisiopatológicas são menores.

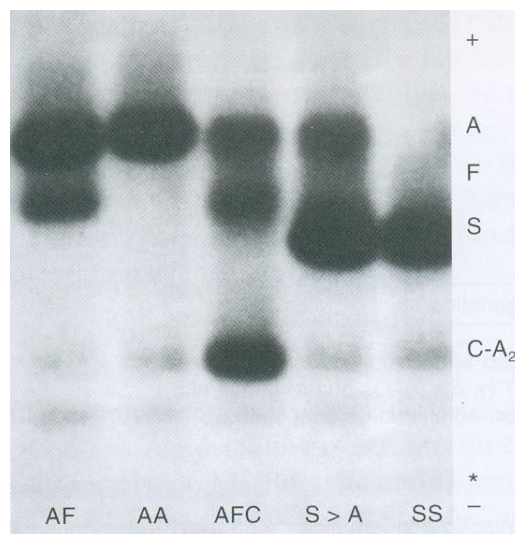
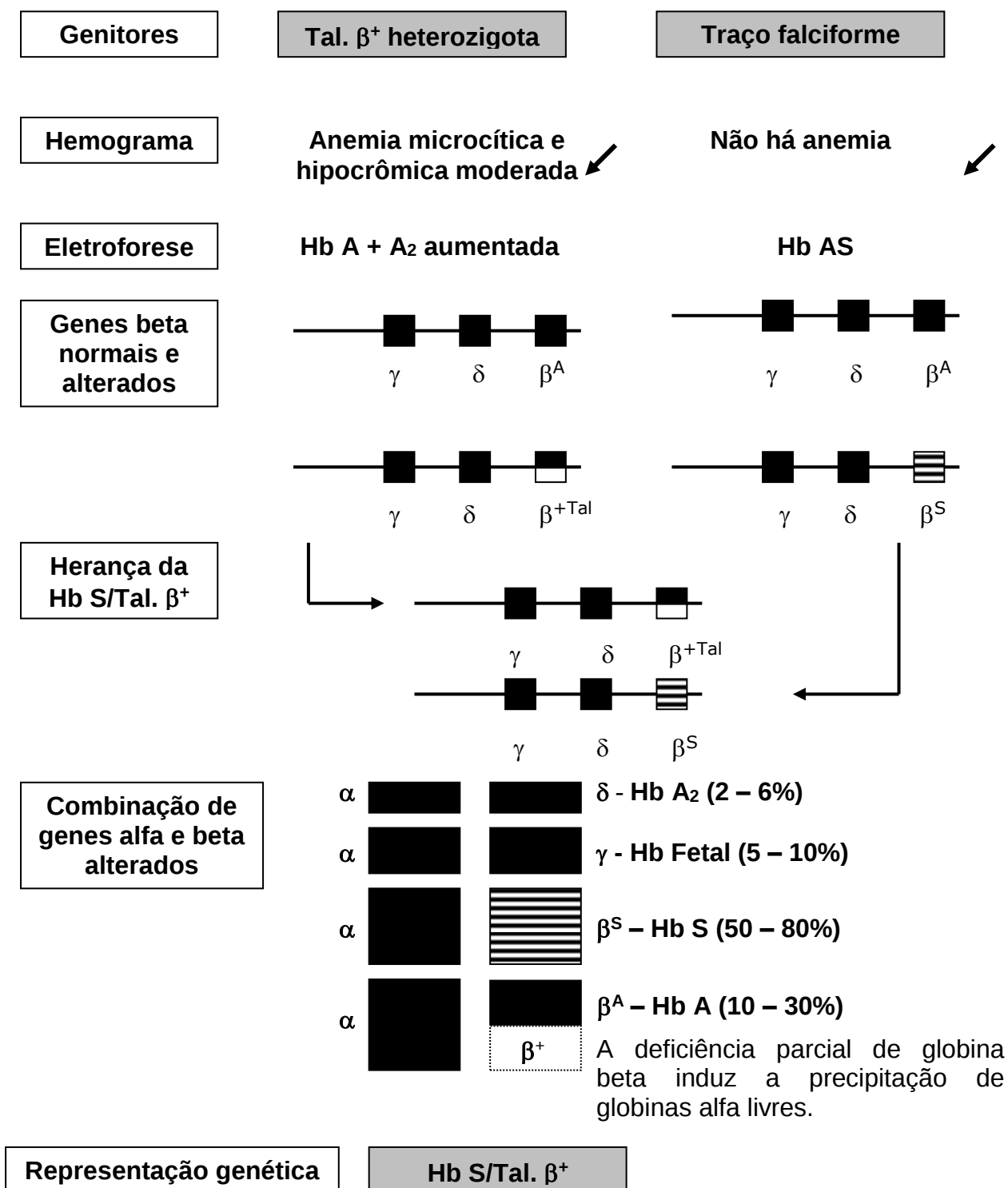


Figura 7.11 – Eletroforese alcalina de hemoglobinas em acetato de celulose. Da esquerda para a direita: AF (talassemia beta maior após transfusão de concentrado de hemácias); AA (padrão normal); AFC (recém-nascido com Hb AC e Hb Fetal elevada devido à idade); S>A (Hb S/Tal. β^+ , com Hb S mais concentrada que a Hb A; SS (Anemia falciforme).

A figura 7.12 apresenta o esquema da herança e conseqüências fisiopatológicas da Hb S/Tal. β^+ . Devido a presença de Hb A - mesmo que em baixas concentrações - o nível de globinas alfa livres é nitidamente inferior em comparação com o caso anterior.



* - Nesta representação só foram incluídos os genes do cromossomo 11 (γ , δ e β). Os quatro genes alfa não foram incluídos, admitindo-os com sínteses normais.

Figura 7.12 – Representação esquemática da herança e das conseqüências fisiopatológicas da Hb S/Tal. β^+ .

É fundamental a realização dos exames eletroforéticos dos pais de portadores de Hb S/Tal. β , onde um deles deve apresentar Hb S (Hb AS, Hb SC, Hb SS ou Hb S/Tal. β) e o outro talassemia beta (Tal. β menor, Hb S/Tal. β ou Hb C/Tal. β). Entretanto os genótipos mais comuns dos pais são: Hb AS x Hb A β (Tal. β menor). Essa avaliação é necessária porque muitas vezes é transfundido sangue com Hb AA para pessoas com anemia falciforme (Hb SS), e nesses casos o resultado eletroforético pós-transfusional é similar ao da Hb S/Tal. β^+ , com a concentração da Hb S maior que a Hb A.

Além do hemograma, com destaque para os índices VCM, HCM e resultados das análises por eletroforeses alcalina e ácida, é necessário que se faça a dosagem de Hb Fetal para o correto estabelecimento do diagnóstico laboratorial da Hb S/Talassemia Beta. A dosagem de metaemoglobina, contagem de reticulócitos, e pesquisa intraeritrocitária de corpos de Heinz constituem excelentes parâmetros para avaliar as consequências fisiopatológicas da doença.

Hb SD – Doença da Hb SD

A Hb D é uma hemoglobina variante com a mesma mobilidade eletroforética da Hb S, porém com diversos tipos estruturais que identificam as Hbs D: Bushman, Iran, Los Angeles, Punjab e Beogrado (figura 6.5 e tabela 6.1). Desses tipos a Hb D Los Angeles, também conhecida por D Punjab, é mais comum em várias regiões do mundo, inclusive no Brasil, onde sua prevalência no estado de heterozigose (Hb AD) ocorre na proporção de um caso para cada 5 mil pessoas analisadas. Por essa razão não é difícil encontrar pessoas com a dupla heterozigose entre hemoglobinas S e D (Hb SD) padecendo de anemia hemolítica crônica, e por isso identificadas como doença de Hb SD. A anemia é variável entre moderada e grave, uma vez que a Hb D participa com certa intensidade do processo de polimerização desencadeado pela

desoxi-Hb S. As tabelas 7.1 e 7.2, mostram características laboratoriais da Hb SD. Pelo fato da Hb SD ter a mesma mobilidade eletroforética das Hb SS e Hb DD nas eletroforeses alcalina de hemoglobinas em gel de agarose e acetato de celulose, a melhor forma de diferenciá-las é por meio da eletroforese ácida em gel de agarose. As concentrações das frações de Hb S e Hb D são equilibradas, oscilando cada uma delas entre 45 e 50%. Além do hemograma e das eletroforeses alcalina e ácida, a contagem de reticulócitos é fundamental para avaliar o grau de eritropoiese do paciente com Hb SD.

Hb SC – Doença da Hb SC

O gene da globina β^C é comum na costa oeste da África, com alta prevalência em Benin, Togo e Gana – regiões que no período do tráfico de escravos constituíam as Costas do Ouro e do Marfim, e de onde vieram grande número de africanos para o Brasil. Assim, a prevalência da Hb AC na população brasileira oscila entre 0,5 e 1%, e entre pessoas de cor negra entre 1 e 3%. Há dois tipos de Hb C descritas na literatura, a **Hb C** com mutação no aminoácido n.º 6 da globina beta caracterizada pela troca de ácido glutâmico por lisina ($\beta 6 \text{ Glu} \rightarrow \text{Lis}$), e a Hb C Harlem com dupla mutação ($\beta 6 \text{ Glu} \rightarrow \text{Lis} + \beta_{73} \text{ Asp} \rightarrow \text{Asn}$). A Hb C Harlem é muito rara em todo o mundo, e também no Brasil, e por ter dupla mutação, uma das quais similar à da Hb S, pode causar discreta falcização dos eritrócitos. Dessa forma, a Hb C ($\beta 6 \text{ Glu} \rightarrow \text{Lis}$) é a que tem sido descrita na dupla heterozigose com a Hb S, causando a doença de Hb SC, com anemia hemolítica crônica com graus variáveis entre moderado a discreto. As alterações laboratoriais podem ser avaliadas nas tabelas 7.1 e 7.2, com destaques para o elevado número de células em alvo e presença de cristais de Hb C nos eritrócitos. Devido à clínica da Hb SC, gestantes portadoras dessa dupla heterozigose devem ter acompanhamento especial durante o período de gestação. A análise laboratorial específica é realizada

por meio de eletroforese alcalina de hemoglobinas em gel de agarose ou em acetato de celulose, com a Hb C separando-se da Hb S e se posicionando junto com a Hb A₂ (figura 7.4). Em eletroforese ácida em gel de agarose a Hb C também é mais lenta que a Hb S (figura 7.13). Pelo fato da mobilidade da Hb C em eletroforese alcalina ser similar às da Hb O Arábia (comum no Oriente Médio) e Hb E (comum no Sudeste Asiático), é importante o uso da eletroforese ácida em gel de agarose, uma vez que nessas condições a Hb O Arábia e Hb E apresentam mobilidade igual à da Hb A, diferenciando-se, portanto, da Hb C.

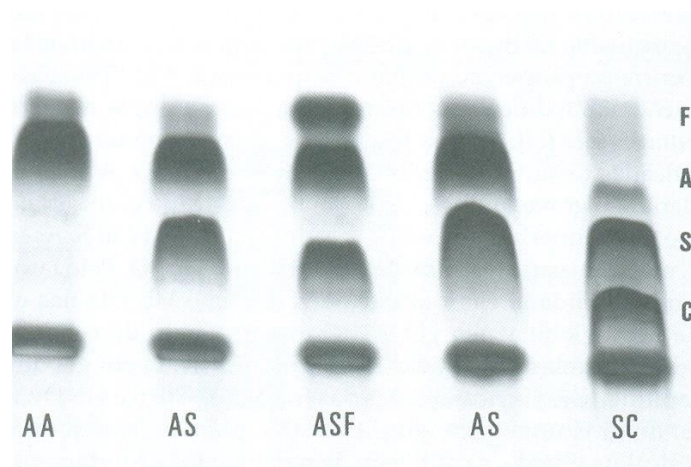


Figura 7.13 – Eletroforese ácida de hemoglobinas em gel de agarose. (1) Hb AA; (2) Hb AS; (3) Hb ASF em sangue de recém-nascido; (4) Hb AS; (5) Hb SC com traços de Hb A proveniente de transfusão de concentrado de hemácias há mais de dois meses.

CAPÍTULO 8: TALASSEMIAS

Co-autor: Flávio Augusto Naoum

Introdução

As talassemias são um grupo heterogêneo de doenças genéticas causadas pela redução da síntese de globinas alfa e não-alfa (β , δ ou γ). Na realidade as formas mais comuns de talassemias se devem à redução de globina alfa ou de globina beta (ver figura 8.1) situações que originam as talassemias alfa ou beta, respectivamente. Situações mais raras envolvem a redução de síntese conjunta de globinas delta e beta (talassemia $\delta \beta$), ou de delta, beta e gama (talassemia $\delta \beta \gamma$). Em alguns casos de talassemias há redução total de síntese de globina alfa ou de beta, caracterizando as talassemias α^0 ou β^0 , respectivamente, por outro lado quando a redução de síntese é parcial denomina-se por talassemias α^+ ou β^+ . Pelo fato da talassemia beta, bem como as hemoglobinas S, C e E serem as mais prevalentes respectivamente nos continentes europeu, africano e asiático, não é raro a ocorrência de interações entre talassemias e essas hemoglobinas variantes: Hb S/Tal. β^0 ; Hb S/Tal. β^+ , Hb C/Tal. β , Hb S/Tal. α e Hb E/Tal. α . As combinações entre genes talassêmicos com Hb S, principalmente, produzem grande diversidade clínica dessa doença genética, com variações que causam desde a morte fetal intra-útero até situações assintomáticas.

A maioria das talassemias obedece ao modelo de herança Mendeliana, caracterizado pela falta de sintomas clínicos nos heterozigotos e pela gravidade clínica nos homozigotos. Assim, clinicamente, as talassemias podem ser classificadas em maior, intermédia, menor e mínima (tabela 8.1). Para melhor exposição das talassemias apresentaremos separadamente as talassemias alfa e beta.

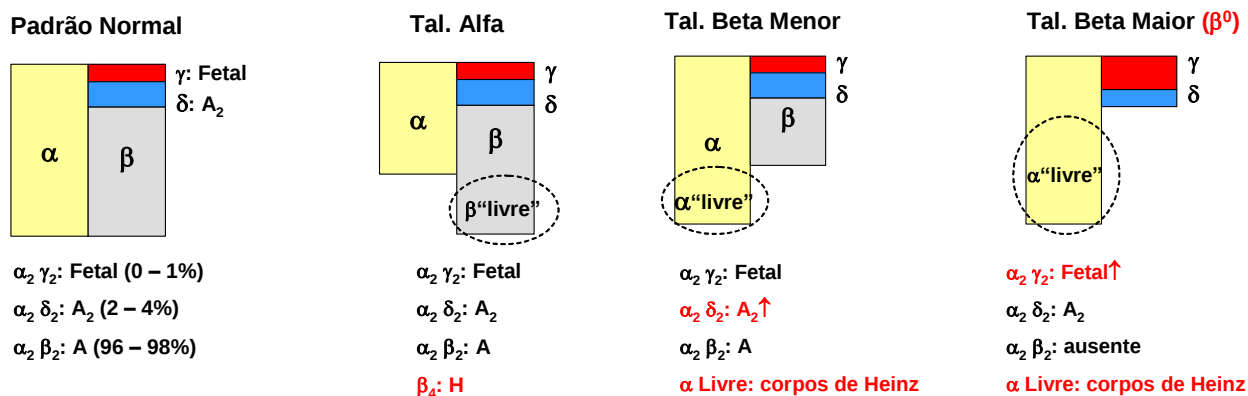


Figura 8.1 – Esquemas ilustrativos da síntese normal para hemoglobinas em comparação com talassemias alfa, beta menor e beta maior.

Tabela 8.1: Classificação clínica das talassemias.

Alterações Clínico-laboratoriais	TALASSEMIAS			
	Maior	Intermédia	Menor	Mínima
Hb (g/dl)	< 7	7 – 10	10 – 13	11 – 15
Reticulócitos (%)	3 – 20	3 – 10	2 – 5	1 – 2
Eritroblastos	+++	++/+	–	–
Aniso-poiquilocitose	++++	+++	++/+	+/-
Icterícia	++	+/-	–	–
Esplenomegalia	+++	++	+/-	–
Alterações ósseas	+++	++	–	–
Dependência de transfusões	+++	+/-	–	–

+: pouco; ++: moderado; +++: acentuado; ++++ muito acentuado; -: ausente.

Talassemia Alfa

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 visualizados quando submetida à incubação com corantes vitais. Esses achados estavam associados às alterações morfológicas dos eritrócitos, desde que afastadas as possibilidades de que a anemia microcítica e hipocrômica fosse devido à deficiência de ferro. A identificação de que a Hb H era composta por tetrâmeros de globinas beta, realizada por técnicas de hibridização e por análises bioquímicas, sugeriu que se tratava de uma doença causada por defeito nos genes alfa. A Hb H tem afinidade ao oxigênio 10 vezes maior do que a Hb A, ausência de efeito Bohr e liga-se ao cromo mais rapidamente do que a Hb A. Os portadores dessa alteração molecular, denominada **doença de Hb H**, apresentavam anemia significativa, hipocromia, microcitose e poiquilocitose, diminuição da fragilidade osmótica, reticulocitose e presença de Hb H nos eritrócitos e em eletroforese.

Em 1965, foi introduzida a técnica de avaliação da síntese de globina alfa e beta, por meio da utilização de reticulócitos incubados com leucina marcada radioativamente. A medida da quantidade de síntese de globina era avaliada pela relação alfa/beta, cujo valor médio se situa em torno de 1,0. Ao analisarem os casos classificados como talassêmicos alfa, os pesquisadores observaram que a relação alfa/beta era menor do que 1,0 e concluíram, por isso, que na talassemia alfa ocorria um decréscimo na síntese de globina alfa.

Em 1974, o Professor Lehmann da Universidade de Cambridge, considerado um dos mais conceituados pesquisadores em hemoglobinopatias, obteve com uma simples observação a resposta sobre o número de genes alfa presentes numa pessoa. Relacionando os casos de hemoglobinas variantes com alterações por trocas de aminoácidos na globina alfa, verificou que todas as Hb variantes de globina alfa

apresentavam concentrações inferiores a 25%, quando associadas com a Hb A. Esse fato levou-o a concluir que cada pessoa possui quatro genes alfa, sendo dois genes em cada um dos cromossomos 16 onde cada um sintetiza cerca de 25% da globina alfa. Em 1978, com utilização de métodos de biologia molecular, ficou comprovada a hipótese do Professor Lehmann.

Na década de 80, os estudos moleculares realizados com os genes de globina alfa revelaram que vários defeitos genéticos podem provocar a talassemia alfa, e que dependendo da extensão da lesão do gene, a síntese de globina alfa apresenta diferentes intensidades de decréscimos, incluindo a ausência total de síntese. Como resultado desse desequilíbrio entre as sínteses de globina alfa e beta, a globina beta continua sendo sintetizada normalmente e, por isso, a “sobra” de globinas beta livres se juntam para formarem tetrâmeros de globinas β_4 , resultando a Hb H. Quanto maior a queda de síntese de globina alfa, maior será também a concentração de Hb H. Nos recém-nascidos, a diminuição da síntese de globina alfa afeta sua relação com a globina gama normalmente sintetizada. Assim, formam-se tetrâmeros de globina γ_4 , resultando na Hb Bart's.

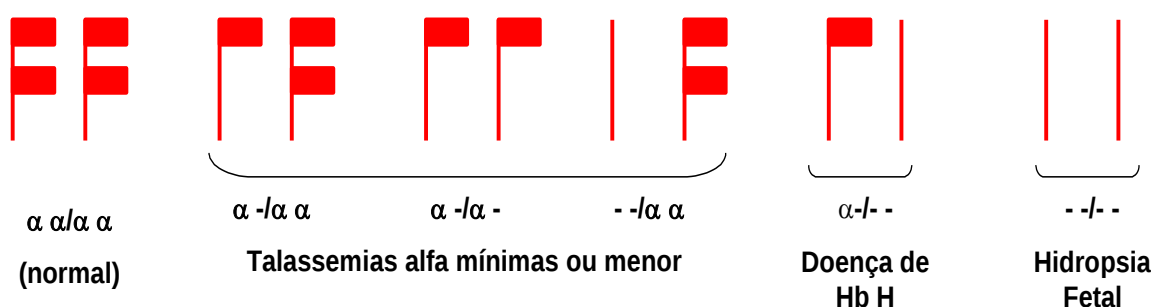
É importante destacar que as talassemias alfa podem ter duas causas de origem: hereditária e adquirida. Evidentemente as formas hereditárias são as mais comuns e atingem, pelo menos, 20% da população brasileira dos quais 17% são assintomáticos e com valores hematimétricos (Hb, Ht, VCM e HCM) normais; 3% tem discretos graus de anemia microcítica e hipocrômica, e 1:5.000 pessoas é portadora da doença de Hb H). As formas adquiridas são secundárias a um processo patológico primário, por exemplo: doenças linfó e mieloproliferativas, anemia sideroblástica, entre outras.

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, representa-se uma pessoa *sem*

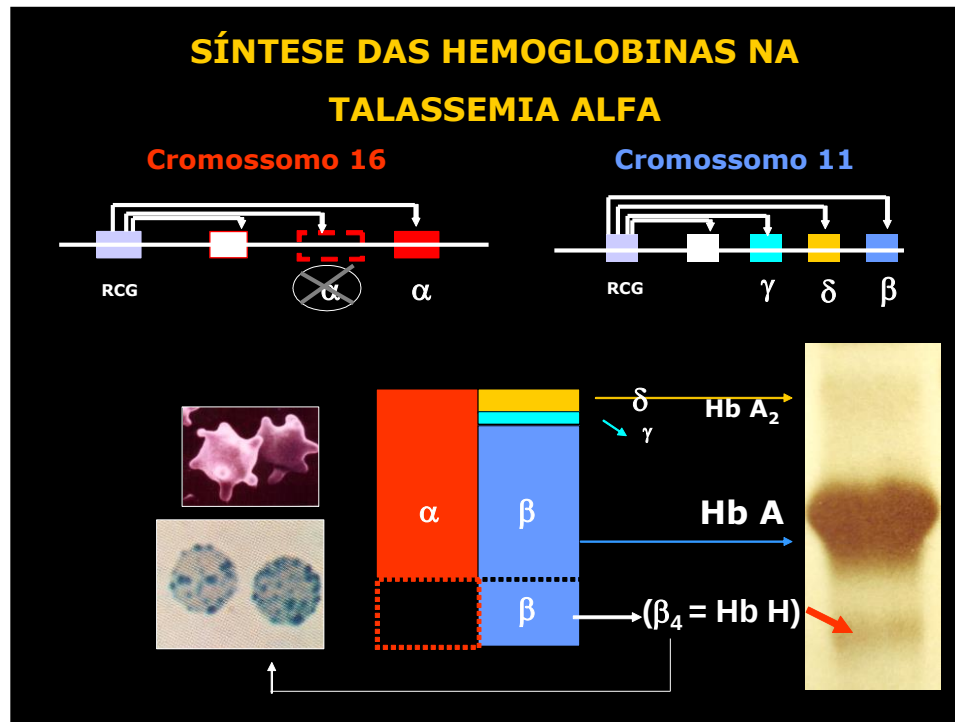
talassemia alfa com seus quatro genes alfa funcionantes ($\alpha, \alpha / \alpha, \alpha$), sendo dois genes alfa de um cromossomo 16 e dois do outro cromossomo 16, provenientes um do pai e outro da mãe.

A lesão que acomete o gene alfa é denominada por deleção, que tem o significado científico de destruído ou eliminado. Assim, as talassemias alfa se devem à deleção de um gene alfa ($-, \alpha / \alpha, \alpha$), de dois genes alfa ($-, - / \alpha, \alpha$) ou ($-, \alpha / -, \alpha$), de três ($-, - / -, \alpha$) e de quatro ($-, - / -, -$). Essas deleções podem atingir parte do gene alfa, diminuindo a sua síntese de globina alfa, e é por isso representado por α^+ . Quando, a deleção atinge integralmente o gene alfa, bloqueando totalmente a síntese de globina alfa, representa-se por α^0 . Portanto, ao representarmos a lesão do gene alfa pelo sinal (-), é compreensível que análises de biologia molecular poderão nos dar a indicação do grau de lesão (α^+ ou α^0). Entretanto, por praticidade, a classificação das talassemias alfa será abordada com a representação genérica da lesão (-). Os esquemas abaixo representam as lesões do gene alfa bem como suas consequências laboratoriais:

Esquema 1: Tipos de lesões que causam talassemia alfa.



Esquema 2: Representação da lesão do gene alfa no cromossomo 16 e suas consequências nos eritrócitos e a visualização da Hb H em eletroforese alcalina em acetato de celulose.



As talassemias alfa pela sua diversidade de manifestações clínicas e laboratoriais são também conhecidas por síndromes alfa talassêmicas. Essas variabilidades podem ocorrer dentro de cada grupo étnico, dependendo da especificidade de mutações e de como se expressam.

De uma forma geral, as síndromes alfa talassêmicas são classificadas em: *portador "silencioso"* (ou talassemia alfa mínima), *traço alfa talassêmico* (ou talassemia alfa menor), *doença de Hb H* (ou talassemia alfa intermédia) e *hidropsia fetal*.

Portador "silencioso" – é o tipo mais comum entre as talassemias alfa e se deve à deleção de apenas um gene alfa ($-\alpha/\alpha,\alpha$). O portador desse tipo de talassemia é assintomático, e embora o volume corpuscular médio (VCM) se apresente como discretamente microcítico ($VCM < 80$), a

morfologia eritrocitária é geralmente normal com microcitose em algumas células. A análise eletroforética de hemoglobina hemolisada com saponina a 1% pode revelar traços de Hb H que representam concentrações inferiores a 1%. Da mesma forma, se a análise for efetuada em sangue de cordão umbilical, ou recém-nascidos, a concentração de Hb Bart's (γ_4) situa-se entre 1 e 2%. A pesquisa intra-eritrocitária de Hb H, após 30-60 minutos de incubação do sangue com azul de cresil brilhante a 37°C, pode revelar uma célula positiva para cada 1.000 ou 2.000 pesquisadas. Entretanto, nem sempre que aparece o traço de Hb H na eletroforese, a pesquisa intra-eritrocitária de Hb H resulta positiva. O diagnóstico laboratorial do portador silencioso de talassemia alfa requer uma série de informações: discreta microcitose, com valores de Hb (g/dL) próximo do limite inferior da normalidade, não-responsiva ao tratamento com ferro, história familiar, e identificação da Hb H em pelo menos um dos testes: eletroforese ou pesquisa citológica. A prevalência média do portador silencioso para talassemia alfa é próximo de 17% na população brasileira.

Traço alfa talassêmico – se deve à deleção de dois genes alfa ($-,-/\alpha,\alpha$) ou ($-, \alpha/ -, \alpha$). Os portadores, apesar de serem normais sob o ponto de vista clínico, reclamam de fraqueza, cansaço, dores nas pernas e palidez. Apresentam microcitose com alterações da morfologia eritrocitária e discreto grau de anemia (Hb: 11 a 13g/dL, VCM e HCM diminuídos). A análise eletroforética da hemoglobina hemolisada com saponina a 1% mostra a presença de Hb H com concentrações próximas de 2% (fig.8.2).

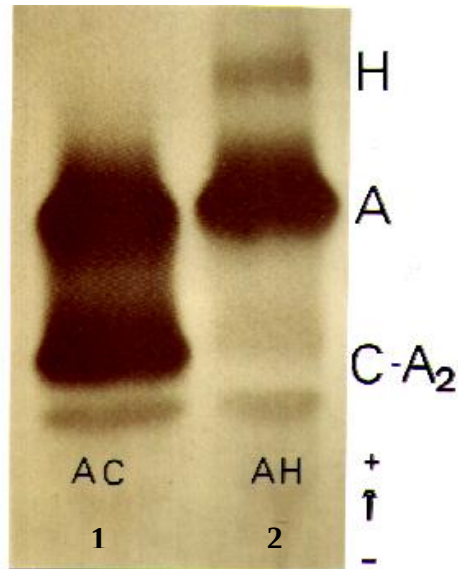


Figura 8.2 – Eletroforese de hemoglobinas em acetato de celulose pH 8,6. (1) portador de Hb AC; (2) portador de traço alfa talassêmico.

A pesquisa intra-eritrocitária de Hb H, após 30-60 minutos de incubação a 37°C com azul de cresil brilhante, permite a visualização de uma célula positiva para cada 250 a 500 pesquisadas (fig.8.3).

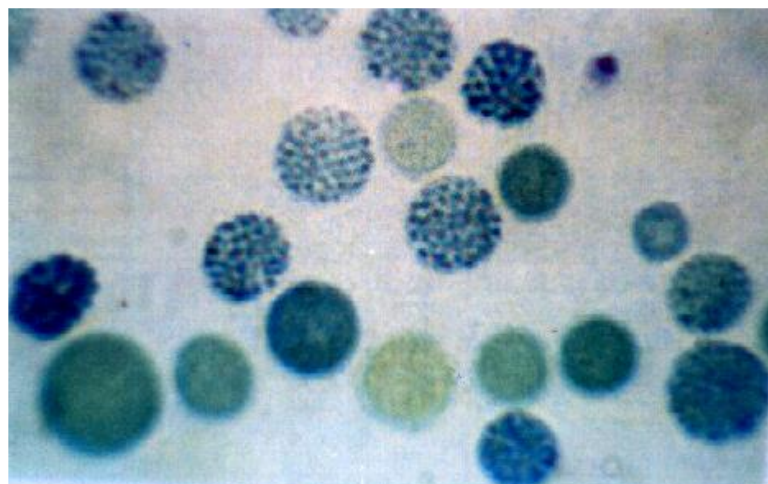


Figura 8.3 – Precipitados intra-eritrocitários de Hb H em sangue de portador do traço alfa talassêmico, incubado a 37°C com azul de cresil brilhante por 60 minutos.

Da mesma forma que o caso anterior, a história clínica do paciente e o estudo familiar são fundamentais para se chegar ao diagnóstico do traço alfa talassêmico. Sua prevalência na nossa população é próxima dos 3%. A detecção do traço alfa talassêmico é mais sensível de se realizar em sangue de cordão umbilical ou em recém-nascidos com um mês de idade, pois a Hb Bart's apresenta-se com concentrações variáveis entre 5 e 10%.

Doença de Hb H – é causada pela deleção de três genes alfa ($-,-,-,\alpha$) . Essa patologia se expressa com uma forma moderadamente grave de talassemia, caracterizada por anemia microcítica e hipocrômica, hemoglobina total variável entre 8 e 11g/dL, aumento do baço e do fígado, e em alguns casos observa-se deformidades similares às que ocorrem na talassemia beta intermédia. A hemoglobina H separada por eletroforese alcalina, em sangue hemolisado com saponina a 1%, apresenta-se bem visível, pois sua concentração atinge até 20% (figura 8.4). A Hb H intra-eritrocitária é facilmente identificada pela sua presença em vários eritrócitos em um mesmo campo microscópico (figura 8.5). Em recém-nascidos, a Hb Bart's apresenta-se com concentrações entre 20 e 30%. A doença de Hb H é rara no Brasil, apesar de vários relatos científicos provenientes de diferentes regiões do país.

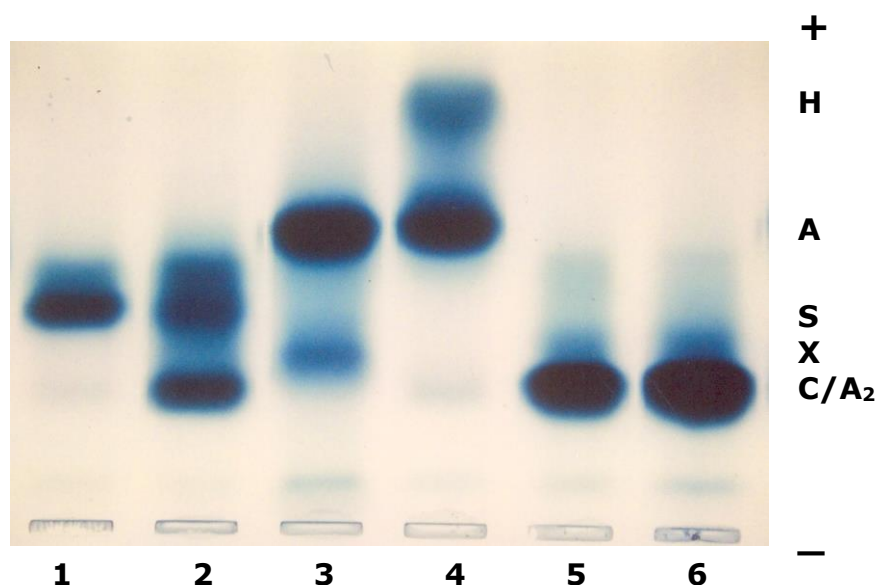


Figura 8.4. – Eletroforese de hemoglobinas em gel de agarose alcalina. O caso nº 4 é específico de doença de Hb H, com concentrações de 20% desta hemoglobina, 79% de Hb A e 1% de Hb A₂. Os outros casos são: 1: Hb SS; 2: Hb SC; 3: Hb A + Hb Instável Koln; 5 e 6: Hb CC.

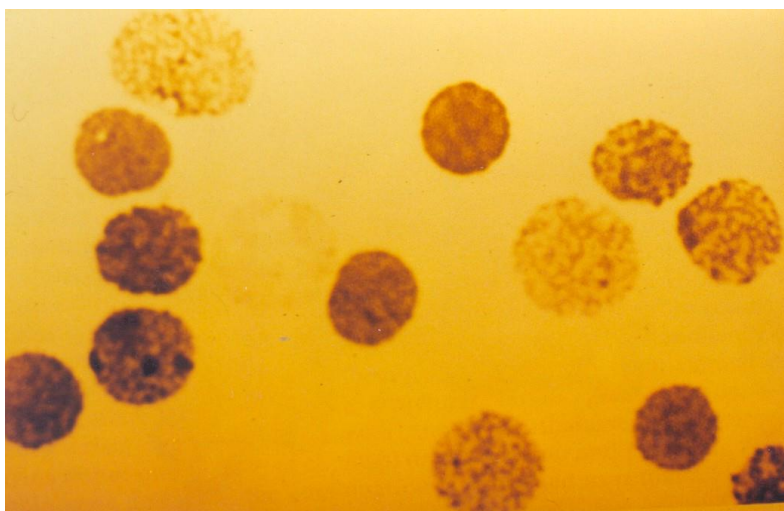


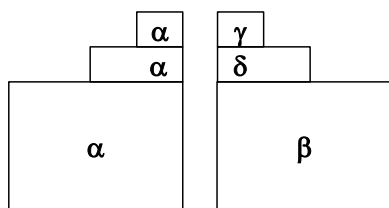
Figura 8.5 – Precipitados intraeritrocitários de Hb H na doença de Hb H.

Hidropsia Fetal – é a forma mais grave de todos os tipos de talassemias (alfa e beta), pois é uma forma letal. É uma situação comum no Extremo Asiático, sendo, entretanto, esporádica no Brasil. As crianças recém-nascidas afetadas pela deleção dos quatro genes alfa (-,-/-,-) apresentam anemia muito grave, com hemoglobina inferior a 7g/dL, eritroblastose fetal, edema, grande aumento do baço e do fígado, e morte com poucas horas após o nascimento. Eletroforeticamente, a concentração de Hb Bart's, está entre 80 e 100%, e a Hb H entre 10 e 20%.

A tabela 8.2 e a figura 8.6 apresentam um resumo dessas quatro condições básicas de talassemia alfa.

Tabela 8.2 – Síndromes alfa talassêmicas. Sinopse geral da relação entre deleção dos genes alfa e consequências fisiopatológicas.

Tipo de talassemia	Deleção do gene	Alterações hematológicas	Alterações Clínicas	Alterações laboratoriais
Portador silencioso ou Talassemia alfa mínima	$(-, \alpha/\alpha, \alpha)$	Discreta microcitose ou normocitose VCM: 75-80 HCM: 24-27	Nenhuma	Traços de Hb H na eletroforese P.I.E. de Hb H: 1/1.000 a 2.000
Traço talassêmico ou Talassemia alfa menor	$(-, -/\alpha, \alpha)$ ou $(-, \alpha/-, \alpha)$	Microcitose hipocromia anemia (Hb: 11-13g/dL) VCM: 65-75 HCM: 20-24	Geralmente assintomático	Hb H: ~2% P.I.E. de Hb H: 1/250 a 500
Doença de Hb H ou Talassemia alfa intermédia	$(-, -/-, \alpha)$	Microcitose hipocromia anemia (Hb: 8-11g/dL) VCM: 55-65 HCM: 20-24	Anemia hemolítica moderada	Hb H: 10-20% P.I.E. de Hb H: em todos os campos do microscópio
Hidropsia fetal ou Talassemia alfa maior	$(-, -/-, -)$	Anisocitose poiquilocitose eritroblastose anemia (Hb: <7g/dL) VCM: 100-110* HCM: diminuído	Morte neonatal com anemia hemolítica grave	Hb Bart's: 80-100% Hb H: 10-20%
P.I.E.: Pesquisa intra-eritrocitária.		*: Elevação do VCM devido a reticulocitose.		

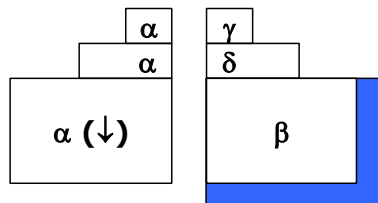


- Hb Fetal → 0-1%
- Hb A₂ → 2,0 – 3,5%
- Hb A → 96-98%

Padrão de equilíbrio
normal de globinas

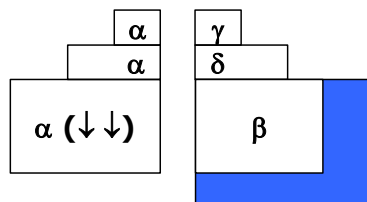
Alfa Talassemia

- Traços de Hb H na eletroforese
- Precipitados de Hb H nos eritrócitos
- Discreta microcitose
- Anemia (±)



Doença de Hb H

- Hb H (10-20%) na eletroforese
- Precipitados de Hb H nos eritrócitos
- Anemia microcítica – hipocrômica (+, ++)
- HCM ↓
- Hb A₂ ↓
- Esplenomegalia



Síndrome Hidrópica (Hidropsia Fetal)

- Hb Bart's 80-100%
- Hb H – 10%
- Anemia eritoblástica (++++)

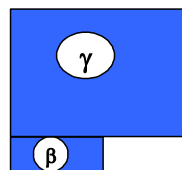


Figura 8.6 – Representação esquemática da fisiopatologia da talassemia alfa, relacionando o traço alfa talassêmico, a doença de Hb H e a hidropsia fetal com a diminuição de síntese da globina alfa.

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. Esse processo é mais grave e proporcional ao número de genes alfa afetados e consequentemente com diminuição de síntese de globina alfa, conforme pode ser apreciado na figura 8.6 e tabela 8.2. Da mesma forma, os graus de hemólise e de anemia também estão na dependência da quantidade de Hb H precipitada nos eritrócitos.

Base molecular da Talassemia Alfa

O agrupamento de genes alfa está localizado no braço curto do cromossomo 16, e contém três genes ativos: o gene zeta da fase embrionária, e os genes α_1 e α_2 (vide esquema abaixo). A sequência de bases nitrogenadas nos dois genes alfa é idêntica, podendo, entretanto, ocorrer algumas diferenças em situações anormais, por exemplo: o “crossing-over” desigual (fig. 8.7) com resultados desproporcionais em relação ao número de genes alfa por cromossomo 16. Atualmente se sabe que o gene α_2 produz de duas a três vezes mais RNA mensageiro que o gene α_1 , mas a mensagem do gene α_1 é traduzida com maior rapidez e, por isso, a diferença de síntese entre os genes α_2 e α_1 não é tão grande como se poderia esperar. A figura 8.8 mostra que cada gene alfa está localizado dentro de regiões de homologia, representadas pelas letras, X, Y e Z, e que são interrompidas por duas regiões curtas e não-homólogas, para cada espaço de 4,2Kb (entre os genes $\psi\alpha_1$ e α_2) e 3,7Kb (entre os genes α_2 e α_1). É importante destacar que no agrupamento de genes alfa, representado pela seguinte proposição esquemática:

$5' \dots \zeta_2 - \psi\zeta_1 - \psi\zeta_2 - \psi\alpha_1 - \alpha_2 - \alpha_1 - \theta_1 \dots 3'$

há duas regiões hipervariáveis, uma localizada entre o gene ζ_2 e o $\psi\zeta_1$, o outro após o gene θ_1 . Por essa razão ocorrem consideráveis variações na estrutura do agrupamento de genes alfa em pessoas consideradas normais para a expressão de síntese de globina alfa. Assim, embora a maioria das pessoas tenha quatro genes alfa ($\alpha, \alpha / \alpha, \alpha$), cerca de 2% da população mundial tem cinco genes ($\alpha, \alpha, \alpha / \alpha, \alpha$).

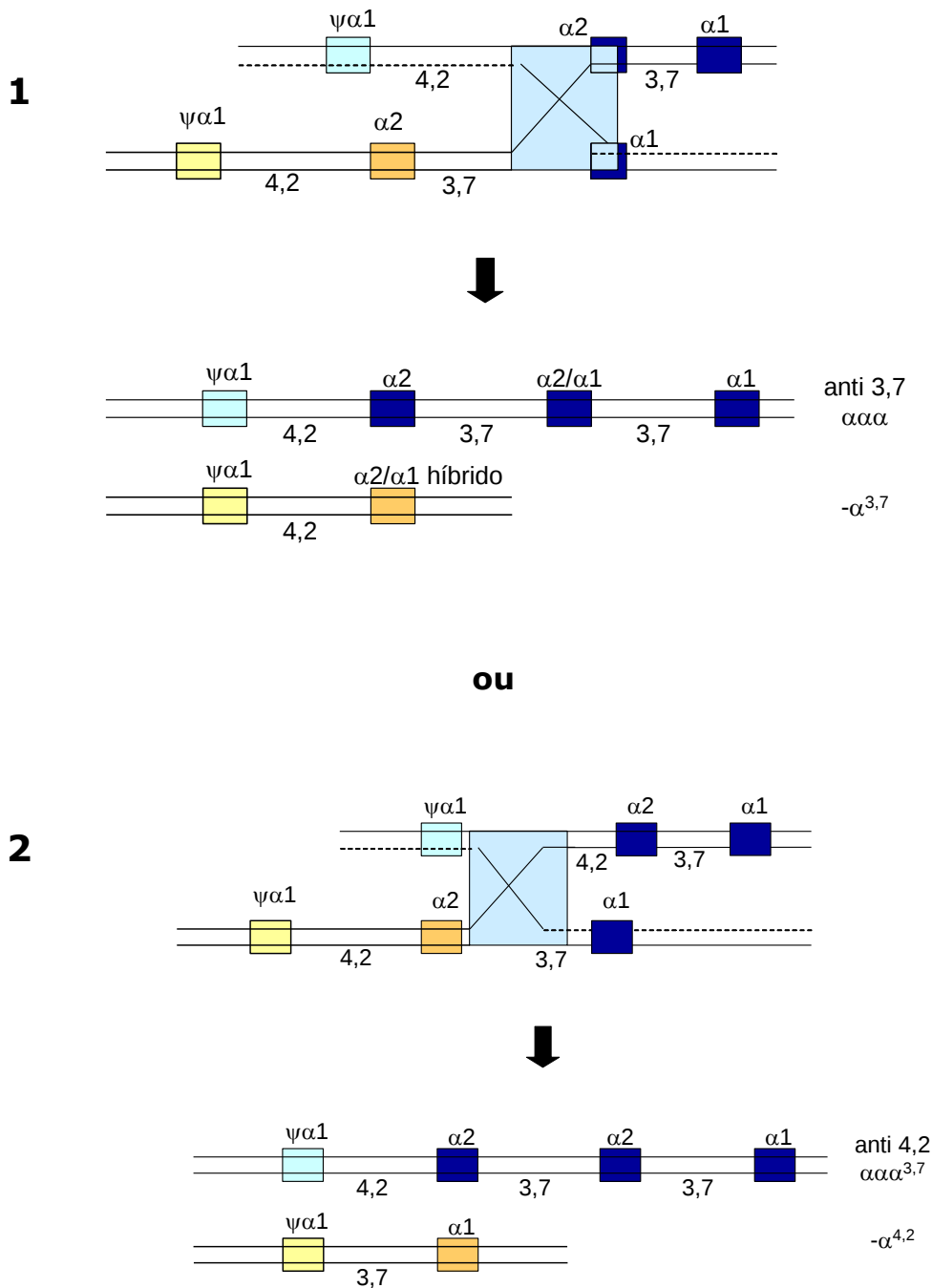


Figura 8.7 – “Crossing-over” desigual entre dois cromossomos 16. (1) inserção de três genes alfa ($\alpha^2, \alpha^2/\alpha^1, \alpha^1$) num dos cromossomos, e representado por $\alpha\alpha\alpha^{\text{anti}3,7}$. No outro cromossomo, restou apenas um gene híbrido (α^1, α^2), e representado por $-\alpha^{3,7}$. (2) da mesma forma esse processo genético pode ocorrer sem formação de genes alfa híbridos, e são representados por $\alpha\alpha\alpha^{\text{anti}4,2}$ e $-\alpha^{4,2}$.

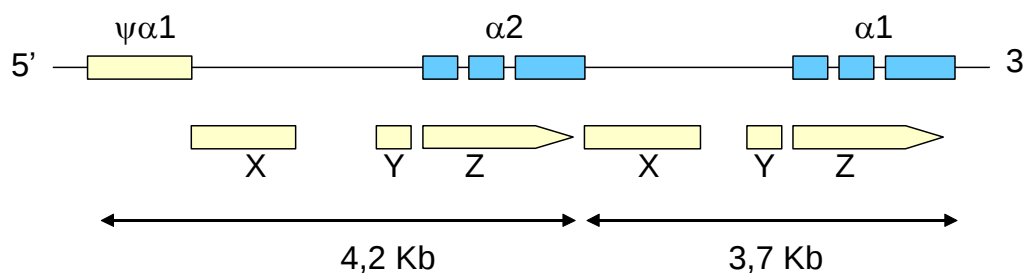


Figura 8.8 – Regiões homólogas entre os espaços $\psi\alpha^1$ e α^2 , e entre os genes α^2 e α^1 . Essas regiões homólogas têm diferentes tamanhos em números de bases nitrogenadas: 3,7Kb e 4,2Kb, e são denominadas de X, Y e Z. Entre as regiões homólogas X e Y, e entre Y e Z, localizadas no espaço de 4,2Kb, há dois espaços que correspondem às regiões não-homólogas. O raciocínio é o mesmo em relação às regiões homólogas e não-homólogas localizadas no espaço 3,7Kb. O tamanho das regiões homólogas nos espaços 3,7 e 4,2 são iguais, enquanto os das regiões não-homólogas são diferentes.

As mutações mais comuns que afetam as atividades de síntese de globina alfa podem ser por deleção e não-deleção. As deleções ocorrem particularmente por efeito de “crossing-over” desigual devido ao desalinhamento entre os cromossomos 16 durante o processo de meiose (fig. 8.7). O “crossing-over” entre as regiões homólogas do tipo Z, geralmente envolve mudanças entre os genes α_1 e α_2 deletando 3,7Kb de DNA, e deixando um simples gene α_2 , ou um gene alfa híbrido α_1/α_2 , num dos cromossomos. Esse defeito é conhecido por deleção $-\alpha^{37}$. No outro cromossomo com três genes alfa ($\alpha\alpha\alpha$), o portador não é afetado, pois não se demonstrou até o presente nenhuma desvantagem seletiva, desde que associado a combinações, com os genes do tipo beta normais (γ , δ e β^A). O “crossing-over” entre as regiões X não envolve genes, perdendo 4,2Kb, e por isso a mutação é conhecida por deleção $-\alpha^{4,2}$. O “crossing-over” envolvendo a região Y ainda não foi identificado.

A nomenclatura das falhas de expressão do gene alfa está especificamente relacionada com a quantidade de produção de globina alfa. Denomina-se de talassemia α^0 , quando determinado gene alfa não

sintetiza globina alfa, enquanto àqueles com síntese apenas reduzida refere-se como talassemia α^+ .

Os haplótipos normais para globina alfa são representados por $\alpha\alpha$, indicando os genes α_2 e α_1 , respectivamente. O indivíduo com produção normal de globina alfa tem seu genótipo representado por dois haplótipos $\alpha\alpha$ ($\alpha, \alpha/\alpha, \alpha$).

Quando ocorre deleção do gene alfa, envolvendo um gene alfa ($-\alpha$) ou os dois genes alfa ($- -$) é possível conhecer a extensão da lesão por estudos moleculares. A deleção $-\alpha^{3,7}$ indica o desaparecimento de 3,7Kb do complexo gênico. Quando o tamanho de uma deleção não está bem estabelecido, usa-se identificá-la pelo local de proveniência do portador, por exemplo: a representação $-\text{Med}$ descreve uma deleção de ambos genes alfa obtida de análise de material proveniente da região do mar Mediterrâneo.

Talassemias α^0 – até o presente se conhece pelo menos, 12 deleções embora acredita-se que há mais de 100 tipos de deleções, envolvendo os dois genes alfa (α_2 e α_1), conforme mostra figura 8.9. Análises detalhadas sugerem quebras na região do agrupamento dos genes e pseudogenes do agrupamento alfa, similares estruturalmente aos que ocorrem nas translocações cromossômicas que originam algumas doenças malignas. Esse contraste com os defeitos $-\alpha^{3,7}$ e $-\alpha^{4,2}$ que são deleções comuns em diversas populações, os tipos α^0 tem limitadas distribuições geográficas, e cada uma representa uma forma rara e incomum ocorrida por algum acidente genético.

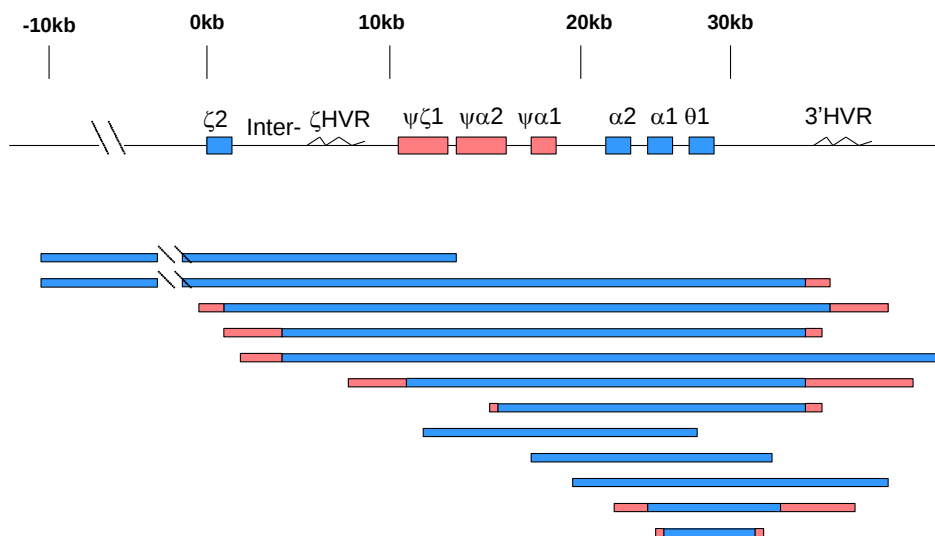


Figura 8.9 – Sumário esquemático dos principais tipos de deleções no agrupamento de genes alfa, cujos resultados se manifestam pela perda de expressão dos genes alfa. Por exemplo: a deleção $\alpha\alpha^{RA}$ atinge a região hipervariável (HVR) e o gene ζ_2 , a deleção $-_{MC}$ atinge todos os genes do agrupamento.

Talassemias α^+ – é o defeito molecular mais comum, envolvendo a deleção de um dos genes alfa, conforme mostra a figura 8.2. O nível de expressão do gene alfa que não foi afetado exerce sua atividade de síntese que expressa diferentemente e proporcionalmente ao número de genes alfa ativos. Destaca-se, entretanto, que a avaliação mais precisa é efetuada pela medida de produção do RNAm específico para o gene alfa em ambos os cromossomo 16. São cinco deleções que ocorrem na talassemia α^+ : $-\alpha^{3,1}$, $-\alpha^{3,711}$, $-\alpha^{3,7111}$, $-\alpha^{4,2}$ e $-\alpha^{3,5}$, todas com capacidade de reduzir a produção de globina alfa. As talassemias α^+ por processo de não-deleção se devem, na maioria dos casos, a simples mutações nas regiões de sequência do gene alfa que são muito importantes para a síntese de globina alfa. A maioria das não-deleções afetam especialmente a expressão de síntese do gene α_2 , agindo em regiões invariantes das bases nitrogenadas, formadas por guanina-timina, trocando-as por outra base, ou interferindo no processo de translação do RNAm maduro. São,

portanto, mutações raras, restritas a determinadas regiões geográficas. Muitas das mutações de talassemias alfa por não-deleção ainda permanecem obscuras, sem que tenham sido caracterizadas.

Talassemia Alfa Adquirida

As talassemias alfa adquiridas são de causas não-genéticas, que geralmente se expressam como se fossem doenças de Hb H. A maioria dos casos descritos aponta a associação com doenças hematológicas, entre as quais se destacam a eritroleucemia, doenças linfó e mieloproliferativas crônicas e agudas, e anemia sideroblástica. Todos os casos confirmados e descritos na literatura científica apresentam pontos comuns: corpos de Hb H intra-eritrocitários, concentrações de Hb H por eletroforese variável entre 10 e 60% e redução da síntese de globina alfa.

Um segundo tipo de talassemias alfa adquiridas está associado ao retardo mental. Estudos familiares mostraram resultados em que nenhum dos pais dos pacientes com este tipo de associação eram portadores de genes para talassemia alfa. Análises citogenéticas efetuadas nesses pacientes não revelaram anormalidades importantes no cromossomo 16. Admite-se, atualmente, que em casos cujo complexo gênico alfa apresenta-se intacto, a expressão dos genes alfa pode ser afetada por deleção dos seus genes vizinhos.

As talassemias alfa adquiridas têm sido identificadas em nosso laboratório desde 1988. Inicialmente, num estudo envolvendo 68 pacientes com doenças linfó e mieloproliferativas observamos que 47% deles apresentavam associação com o traço alfa talassêmico. Posteriormente estudando outros dois grupos de doenças crônicas: Chagas e *Diabetes mellitus*, observamos que os pacientes apresentavam também a presença de Hb H, dentro do quadro típico de traço alfa talassemia, com frequência de 17,3 e 40,7%, respectivamente.

Interação da Talassemia Alfa com mutantes estruturais de globina beta

Os principais mutantes de globina beta: Hb S, Hb C e Hb E, podem ser significativamente afetados pela coexistência da talassemia alfa. Observa-se nesses casos que a concentração da hemoglobina variante, por exemplo, a Hb S, quando em heterozigose (Hb AS/Tal. alfa – figura 8.10), decresce proporcionalmente à quantidade de genes alfa afetados (tabela 8.3). Esse mesmo processo ocorre na Hb C (Hb AC) e Hb E (Hb AE). O efeito da talassemia alfa associada a essas hemoglobinas variantes se deve ao fato das cadeias beta (β^A) estarem carregadas mais negativamente e, por isso, dimerizam-se com maior eficiência do que aquelas carregadas mais positivamente pela mutação sofrida: β^S ($\text{Glu}^- \rightarrow \text{Val}^0$), Hb C ($\text{Glu}^- \rightarrow \text{Lis}^+$) e Hb E ($\text{Glu}^- \rightarrow \text{Lis}^+$). Da mesma forma, essa variação que ocorre na formação de dímeros ($\alpha^A\beta^S$) também difere em relação ao tipo de mutação que originou a talassemia alfa. Indivíduos homozigotos com deleção $\alpha^{3,7}$ têm maior concentração de Hb S (22%) do que aqueles com deleção $-\alpha^{4,2}$ (18%). A figura 8.11, mostra por eletroforese a interação entre Hb SS e doença de Hb H, com visível caracterização da Hb H fracionada difusamente por ser formada por tetrâmeros β_4^S . Esses tetrâmeros de globina β^S são mais instáveis do que os tetrâmeros β^A , cuja Hb H se apresenta mais compacta no fracionamento eletroforético (ver figura 8.2). Sob o ponto de vista da fisiopatologia em pacientes com Hb SS associada ao traço alfa talassêmico, os efeitos patológicos são minimizados.

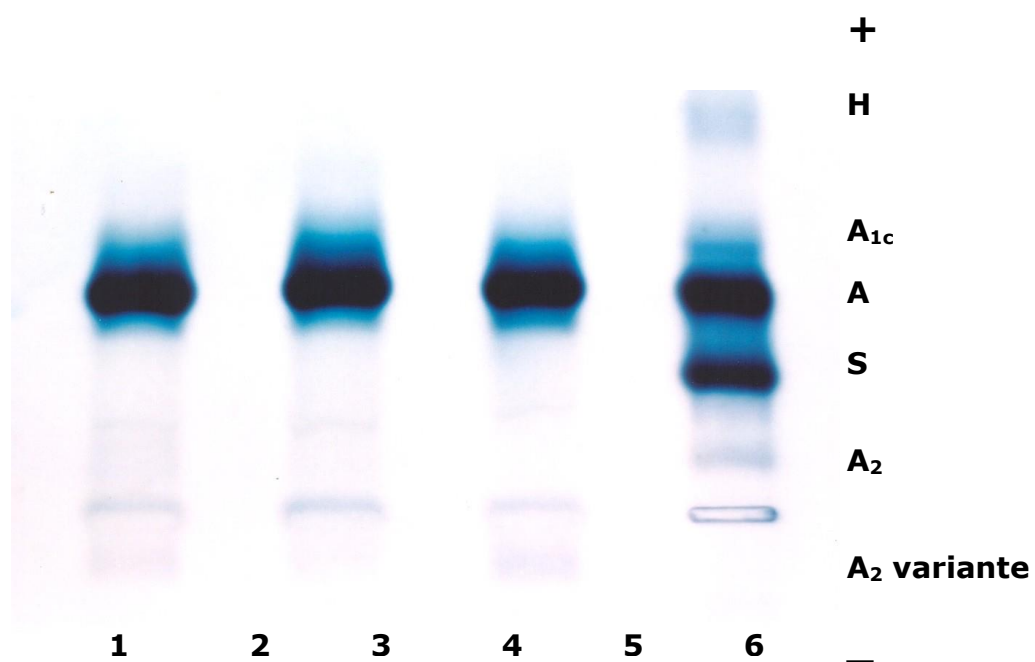
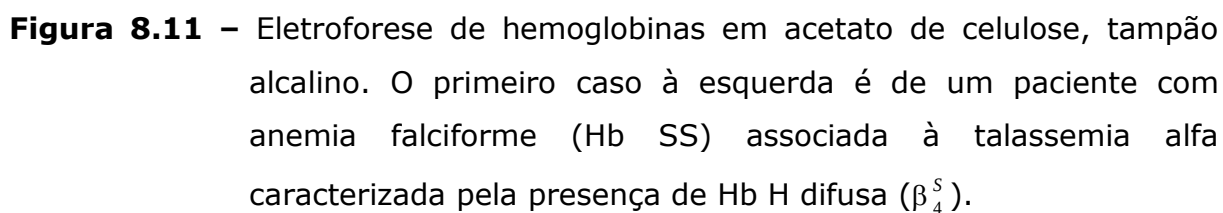


Figura 8.10 – Eletroforese de hemoglobinas em gel de agarose alcalina.

Os casos 1, 2 e 3 pertencem a uma família com Hb A₂ variante (1: mãe; 2: pai; 3: filho). O caso 4 é de um paciente com Hb AS associada a talassemia alfa caracterizada pela presença de Hb H com concentração de 8% (ASH).



Genótipo da globina alfa	Hb (g/dL)	VCM (fL)	alfa/beta	Hb S (%)
$\alpha, \alpha, \alpha / \alpha, \alpha$	13-15	80-90	---	40
$\alpha, \alpha, / \alpha, \alpha$	13-15	80-90	1,0	35-40
$-\alpha / \alpha, \alpha, \alpha$	13-15	80-90	---	35-40
$-\alpha / \alpha, \alpha$	13-14	75-85	0,85	30-45
$-\alpha / -\alpha$	12-13	70-75	0,75	25-30
$-- / -\alpha$	7-10	50-55	0,50	17-25

Interação Talassemia Alfa/Talassemia Beta

Os efeitos fisiopatológicos das talassemias se devem ao desequilíbrio verificado entre as globinas alfa e beta. A interação entre talassemias alfa e beta diminui o grau do desequilíbrio alfa/beta, modificando inclusive os quadros clínicos e hematológicos. O número de genes alfa afetados, associados à talassemia beta homozigota, pode produzir efeito benéfico. Os homozigotos para talassemia β^+ (β^+/β^+ tal.) não dependentes de transfusões são frequentemente diagnosticados como portadores também de talassemia alfa, e seus quadros clínicos se assemelham aos da talassemia intermédia.

A associação entre talassemias alfa e beta heterozigota se apresenta com o quadro típico de talassemia mínima, com Hb A₂ normal ou aumentada e presença mínima de Hb H (~1%). Nesses casos os valores hematimétricos são típicos de talassemia beta menor com VCM e HCM discretamente diminuídos.

Talassemia Beta

As talassemias beta são mais heterogêneas do que as do tipo alfa. Caracterizam-se por uma alteração quantitativa da síntese de globinas beta e são classificadas como talassemias beta zero (ou talassemia β^0) quando não há síntese de globinas, e talassemias beta mais (ou talassemia β^+) quando há alguma taxa de síntese. Consequentemente as globinas alfa, que são sintetizadas normalmente, acumulam-se nos eritrócitos, durante a eritropoiese, causando agregação e precipitação. Os precipitados, formados em quantidades variáveis, danificam a membrana e destroem prematuramente essas células provocando a anemia (figura 8.12).



Figura 8.12: Lesões nas membranas de eritrócitos de pessoa com talassemia beta causadas pela precipitação de globinas alfa livres. Essas globinas livres causam a lipoperoxidação da dupla camada lipo-protéica dos eritrócitos talassêmicos, reduzindo o tempo de vida dessas células.

As supressões parcial e total das globinas beta, bem como das globinas delta e gama situadas no mesmo cromossomo 11, e que dão origem aos diferentes genótipos de talassemias β , δ e γ , estão representados na figura 8.13.

De forma geral, os tipos mais comuns entre as talassemias beta são as heterozigoses: β^A/β^0 , β^A/β^+ mediterrâneo, β^A/β^{++} africano,

β^A/β^+ silenciosa, β^A/β^0 com Hb A₂ normal, e β^A/β^+ com Hb A₂ normal. As talassemias beta homozigotas correspondentes são: β^0/β^0 , β^+/ β^+ mediterrâneo, β^{++}/β^{++} africano, β^+/ β^+ silenciosa, β^0/β^0 com Hb A₂ normal, e β^+/ β^+ com Hb A₂ normal. A tabela 8.4 apresenta as principais características laboratoriais de alguns desses tipos de talassemias beta, nos estados de heterozigose e homozigose. A figura 8.14 representa esquematicamente as consequências laboratoriais da redução parcial ou total da síntese de globina beta, nas talassemias beta heterozigotas (ou menor), e nas talassemias beta homozigotas com redução parcial de síntese de globina beta (β^+/ β^+ ou β^0/β^+) e redução total de globina beta (β^0/β^0), ambos são clinicamente caracterizados como talassemia beta maior.

O modo de herança das talassemias, assim como de outras alterações genéticas da hemoglobina, é autossômico, e o termo dominante ou recessivo é difícil de ser aplicado, porque alguns heterozigotos apresentam claros distúrbios clínicos, ao passo que outros não. No entanto, a talassemia beta é considerada de herança autossômica recessiva, porque são necessários dois genes anormais da globina beta para produzir o fenótipo clinicamente detectável. Recentemente, no entanto, formas dominantes de talassemia beta têm sido identificadas, as quais resultam em fenótipos de talassemia intermédia para portadores de um único gene alterado.

Com a utilização de técnicas de biologia molecular foi possível a identificação de aproximadamente 180 tipos diferentes de talassemias beta, cujas diversidades estão relacionadas com os graus de lesões no gene beta, podendo inclusive atingir os genes delta, pseudogene beta-1, os genes gama alanina e gama glicina e até o gene embrionário épsilon. A figura 8.15 representa por meio de traços azuis a intensidade de lesão por deleção sofrida pelos genes do complexo (β , δ , γ^A , γ^G , $\psi\beta_1$ e ϵ), em alguns casos bem conhecidos de talassemia beta.

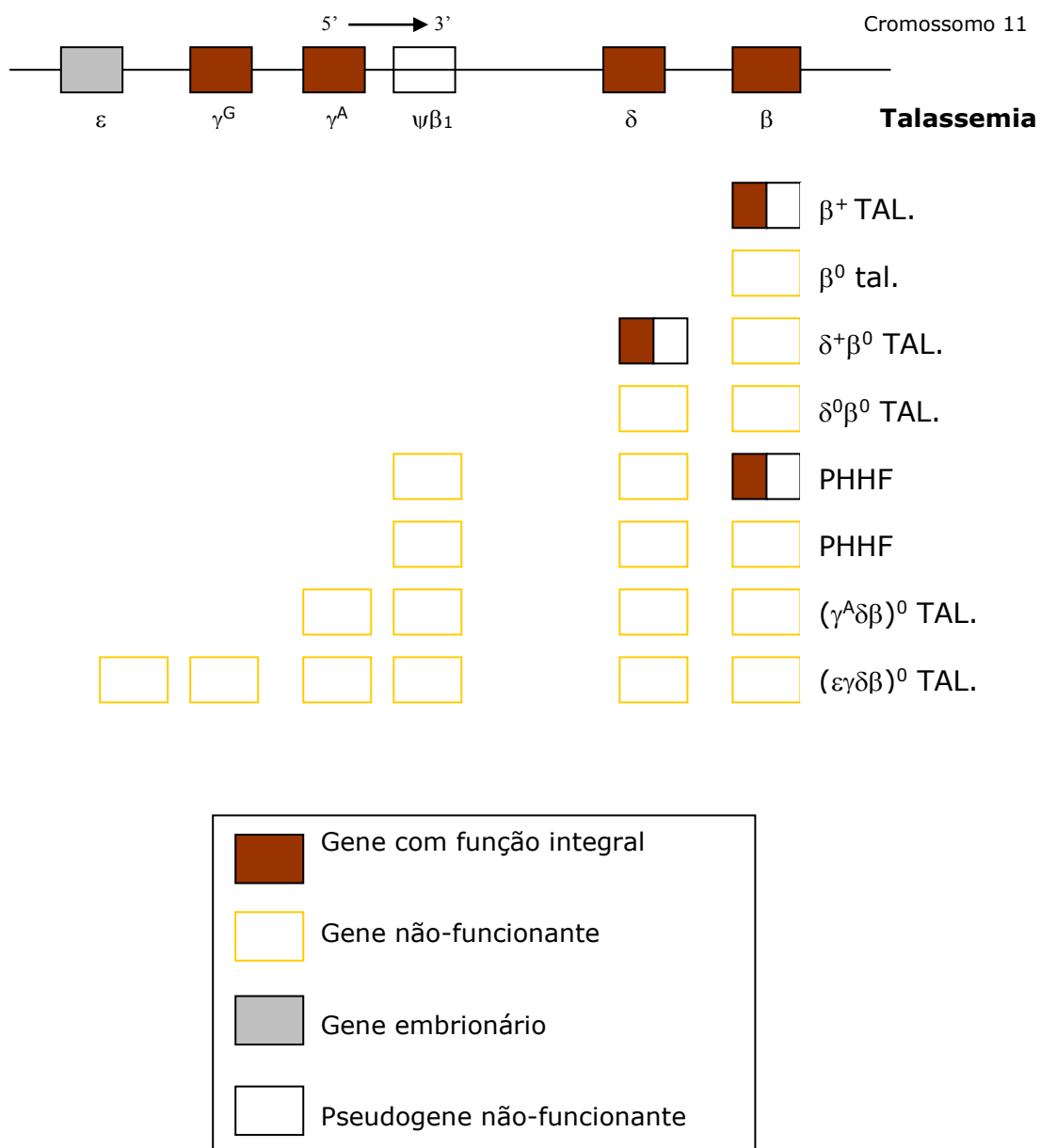
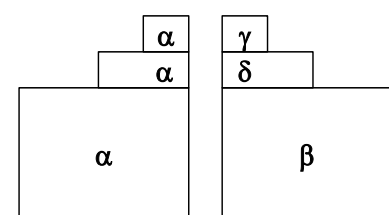
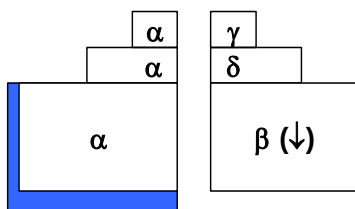


Figura 8.13: Representação esquemática de alguns genótipos de talassemia beta. Os genótipos β⁺ tal. e β⁰ tal. são as formas mais freqüentes seguidas de PHHF (persistência hereditária de Hb Fetal).



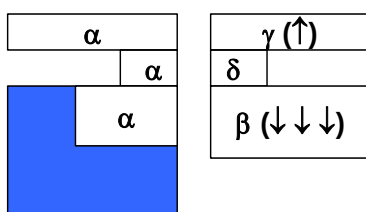
- Hb Fetal → 0-1%
- Hb A₂ → 2,0 – 3,5%
- Hb A → 96-98%

Padrão de equilíbrio normal de globinas



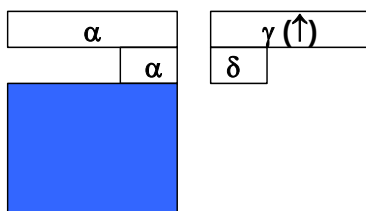
Beta talassemia heterozigota menor

- Hb A₂ ↑
- HCM ↓
- Anemia microcítica – hipocrômica (+)
- Cadeias alfa livre



Beta talassemia homozigota maior (β⁰)

- Hb A ↓
- Hb Fetal ↑↑
- Anemia microcítica – hipocrômica (++++)
- Cadeias alfa livre em excesso
- Aumento da bilirrubina indireta
- Esplenomegalia



Beta talassemia homozigota maior (β⁰)

- Ausência de Hb A
- Hb Fetal ↑↑
- Anemia microcítica – hipocrômica (++++)
- Cadeias alfa livre em excesso
- Aumento da bilirrubina indireta
- Esplenomegalia

Figura 8.14: Relação entre quantidade de globinas alfa livre, níveis de Hb A, Hb A₂ e Hb Fetal, e gravidade do quadro clínico em pacientes com talassemia beta menor e maior.

Tabela 8.4 – Principais características laboratoriais dos tipos mais comuns de talassemia beta.

Homozigoto					Heterozigoto			
Tipo de talassemia	Sinônimo clínico	Anemia	% Hb F	% Hb A ₂	Sinônimo clínico	Anemia	% Hb F	Hb A ₂ (%)
β^+	Cooley, Talassemia maior	++++	~90	Normal ou aumentada	Talassemia menor	$\pm$	Pouco elevada em 50% dos casos	> 4,0
β^+ Mediterrâneo	Cooley	+++	20-80	Normal ou aumentada	Talassemia menor	$\pm$	Pouco elevada em 50% dos casos	> 4,0
β^{++} Africano	Talassemia intermédia	++	20-40	Normal ou aumentada	Talassemia menor	$\pm$	Pouco elevada ou normal	> 4,0
β^+ Silenciosa	Talassemia intermediária	+ / ++	10-30	Aumentada	Talassemia mínima	-	Normal	< 4,0
β^0 ou β^+ com Hb A ₂ normal	Talassemia intermediária	++ / +++	20-80	Normal	Talassemia menor	$\pm$	Normal	2,0 – 4,0
+: graduação de intensidade; (+): discreta; (++) : moderada; (+++): grave; (++++): muito grave; (-): ausente.								

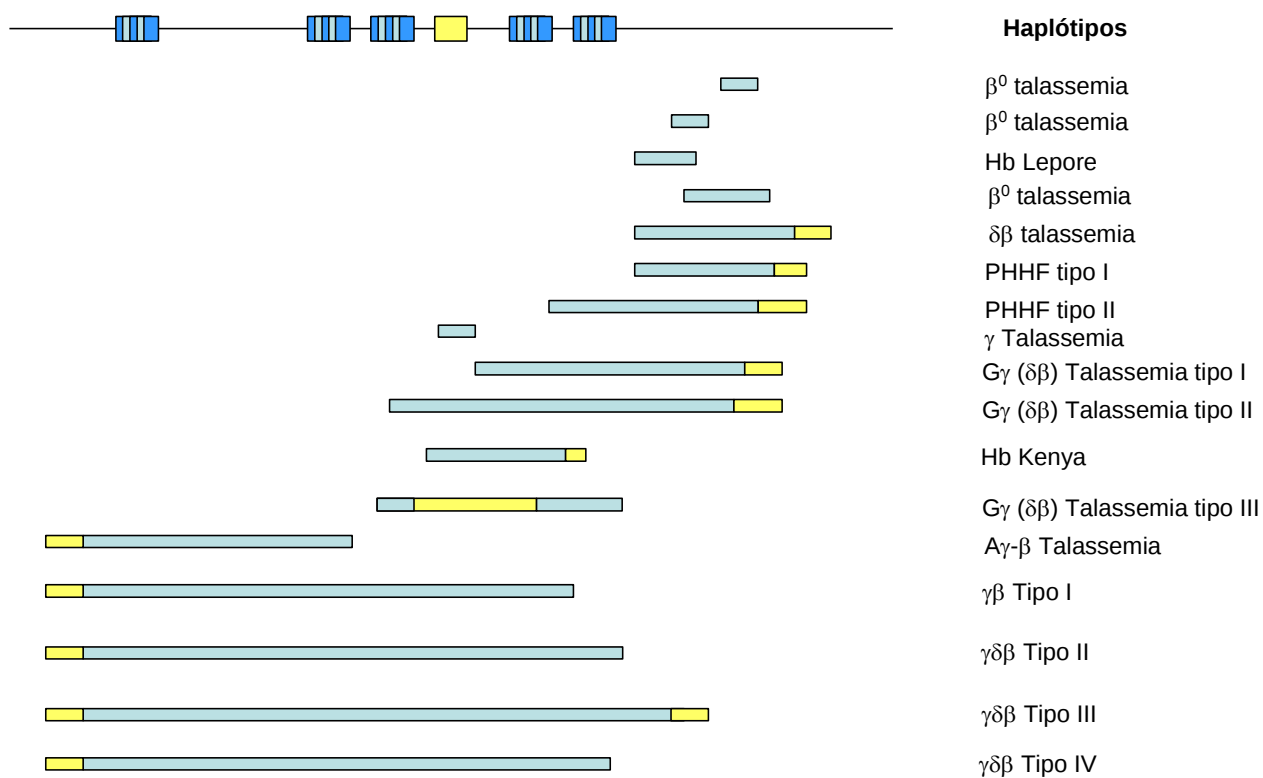


Figura 8.15: Esquema representativo do complexo gênico beta, relacionando os diferentes tipos de deleção que atingem os genes β , δ , γA , γ^G , $\psi\beta 1$ e ϵ , as formas de talassemia beta.

Fisiopatologia

O processo fisiopatológico da talassemia beta está muito relacionado com o desequilíbrio que se verifica entre as sínteses de globina alfa e beta. Com a síntese de globina beta afetada, por diminuição parcial (β^+) ou bloqueio total (β^0), a relação α/β supera o valor de equilíbrio que é de 1,0. A globina alfa, que não teve sua síntese alterada, apresenta produção normal, e como não há globina beta suficiente para formar tetrâmeros $\alpha_2\beta_2$ ocorrerá a presença de globinas alfa livres, cuja intensidade é proporcional à piora do quadro clínico do portador, seja recém-nascido, ou com idade acima de 6 meses, conforme ilustra a figura 8.16.

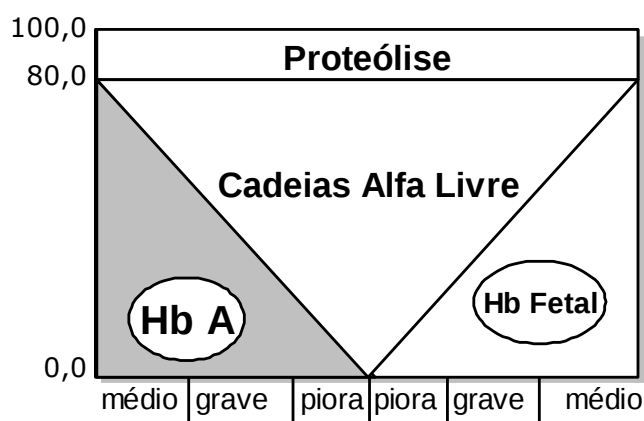


Figura 8.16: Representação gráfica do quadro clínico do paciente com talassemia maior (médio, grave e piora do quadro) relacionados com a quantidade de Hb A e Hb Fetal. Quanto maior a concentração de Hb A ou de Hb Fetal o quadro melhora.

Fisiologicamente o excesso de globinas (ou cadeias) alfa livres se instabiliza e se precipita sob forma de corpos de inclusão nos eritroblastos. Essa precipitação provoca situações patológicas celulares, conforme o local de sua ocorrência. Quando se dá na medula óssea, observa-se uma sequência de fenômenos que se iniciam pela peroxidação dos lipídeos da membrana eritrocitária e geração de espécies ativadas de

oxigênio, os radicais oxidantes ou radicais livres. A célula com baixa hemoglobinizacão é particularmente sensível a esse tipo de agressão tóxico-oxidante, pois a membrana lesada permite a perda de potássio e adenosina-tri-fosfato (ATP), tornando o eritrócito rígido, sem o poder natural da deformabilidade, e como consequência dificulta sua saída da medula óssea para o sangue periférico.

Por outro lado, as células que têm maior hemoglobinizacão, mesmo que seja pela presença de Hb Fetal, apresentam-se com menores graus de lesões e, portanto, maior período de vida. Ainda em nível de células eritroblásticas, a precipitacão de globinas alfa causa o bloqueio da síntese de DNA com consequente interrupção da síntese de globinas. O somatório das situações anteriormente mencionadas: precipitacão de globina alfa, rigidez celular e lesão do DNA, provoca a eritropoiese ineficaz que é responsável pela situacão de anemia e pelo aumento da absorção do ferro.

Quando os eritrócitos com os corpos de inclusões compostos por globinas alfa atingem o sangue periférico, sua rigidez, associada às lesões na membrana eritrocitária (figura 8.12), contribui para o sequestro dessas células durante a circulacão nos sinusóides esplênicos. O resultado dessa atuacão fisiopatológica que se verifica nos doentes talassêmicos é a anemia hemolítica, com aumento da concentracão da bilirrubina indireta e da esplenomegalia. A esplenomegalia pode resultar em hiperesplenismo, pelo aumento da função do baço, levando a um processo mais abrangente de destruicão das células do sangue, gerado a leucopenia e a plaquetopenia. A leucopenia pode contribuir para a instalacão de infecções, constituindo-se em importante causa dos óbitos verificados em doentes com talassemia beta maior. A plaquetopenia induz, por sua vez, o derramamento de sangue nasal (epistaxes).

As consequências provenientes da eritropoiese ineficaz, hemólise e hiperesplenismo resultam em **anemia grave** com anoxia, **cardiopatias** que são importantes causas de óbito na talassemia maior, **hipermetabolismo** com emagrecimento, febre, aumento do nível de

ácido úrico e gota, e a necessidade de **transfusões** repetidas de sangue. Essas transfusões, que se tornam periódicas para os talassêmicos doentes, causam o acúmulo de ferro e da ferritina, podendo ocorrer hepatopatias graves por hepatite transfusional, além de doenças transmissíveis em transfusões, notadamente a AIDS e hepatite C, e esporadicamente doença de Chagas e Sífilis.

Devido à deficiência significativa de globina beta, a formação de hemoglobina fica por conta das globinas alfa e gama, resultando na elevação percentual ou relativa da Hb Fetal. Embora, com baixa concentração corpuscular, a Hb Fetal com sua alta afinidade pelo oxigênio contribui para a anoxia tecidual. A anoxia tem efeitos maléficos ao organismo, predispondo-o às infecções, ao aparecimento de úlceras nas pernas e à interferência na secreção de eritropoietina que promove a hiperplasia eritróide. A hiperplasia eritróide causa o aumento da absorção do ferro, com seu acúmulo sob forma de ferritina. Nesse caso específico de acúmulo de ferro o doente talassêmico grave pode ter várias consequências patológicas desde que não utilize de processos de eliminação do ferro. Outras situações fisiopatológicas importantes se devem à diminuição do nível de folatos, que promove um quadro hematológico em sangue periférico similar ao da anemia megaloblástica, e as lesões ósseas determinam a presença de deformidades do crânio, maxilar e face, baixa estatura e a presença de massas extra-ósseas, ou metaplasias mielóides, com formações tumorais no mediastino e retroperitônio, ou acentuada esplenomegalia e hepatomegalia.

Finalmente, o aumento da bilirrubina indireta, especialmente na talassemia beta maior, produz a excreção de dipirróis pela urina e litíase biliar.

As figuras 8.17, 8.18 e 8.19 mostram de forma esquemática a seqüência dos eventos fisiopatológicos.

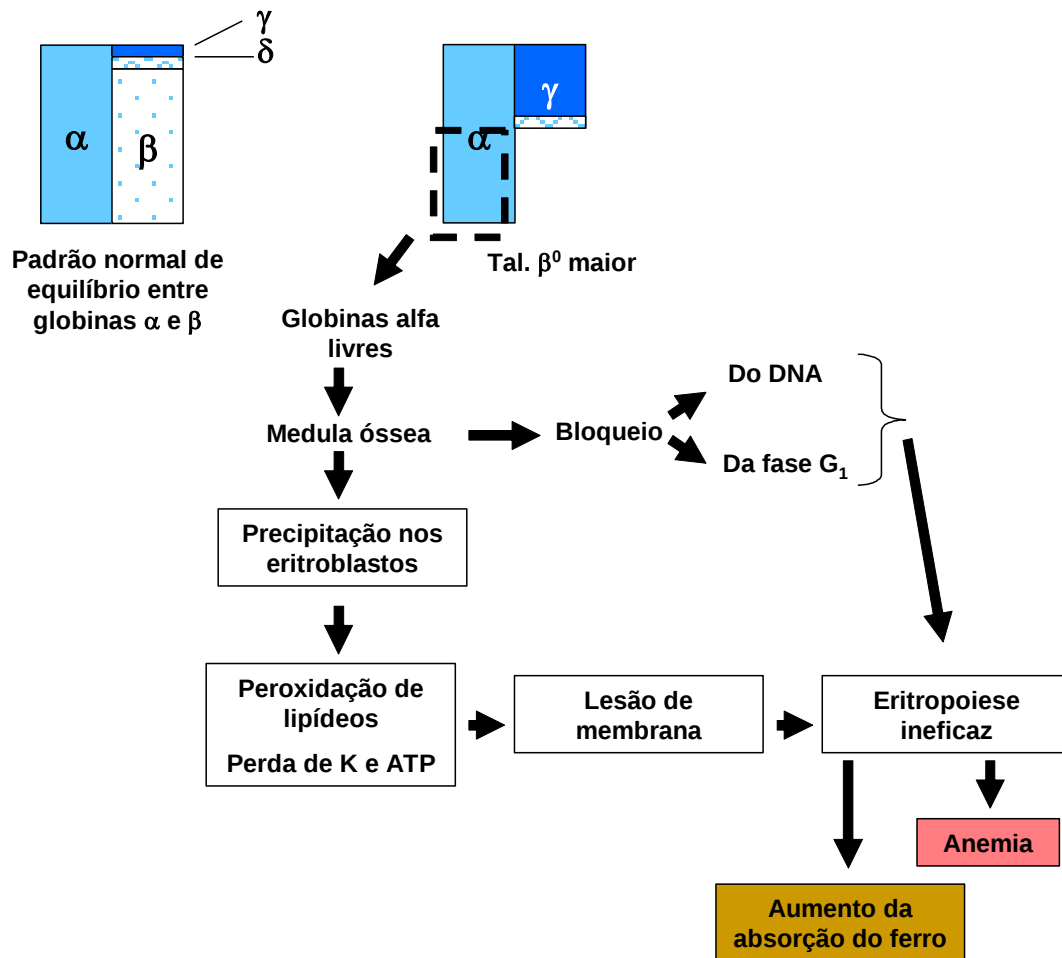


Figura 8.17: Conseqüências fisiopatológicas causadas pelo despareamento de globinas alfa livres.

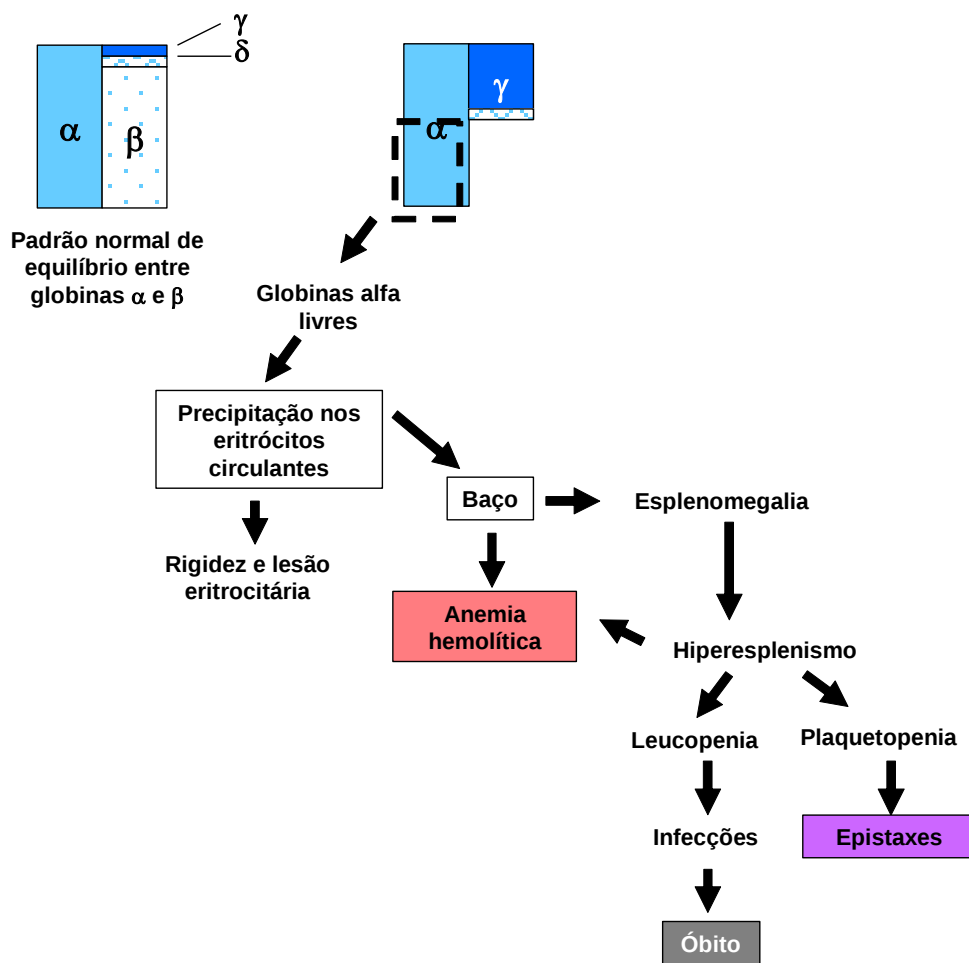


Figura 8.18: Conseqüências fisiopatológicas causadas pelo desapareamento de globinas alfa livres.

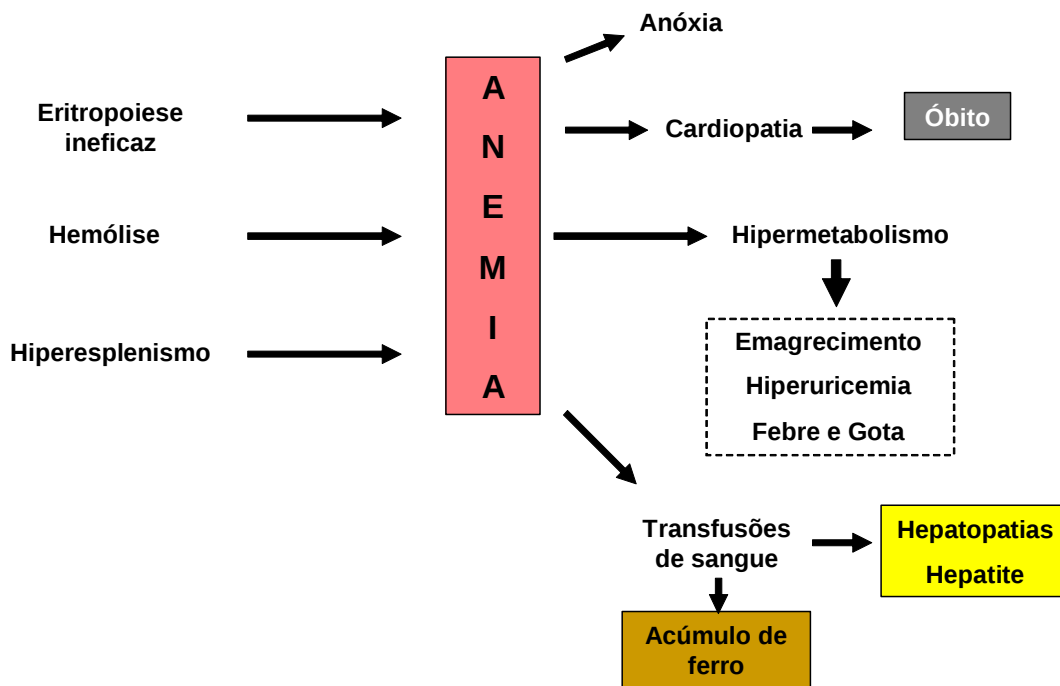


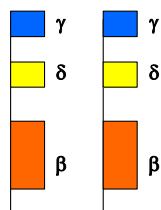
Figura 8.19: Intercorrências comuns na talassemia beta maior.

Talassemia beta homozigota (maior)

O primeiro relato científico da talassemia beta homozigota foi realizado por um pediatra americano, o Dr. Thomas B. Cooley, que juntamente com sua colega Pearl Lee descreveu, em 1925, os achados hematológicos e clínicos efetuados em quatro crianças que apresentavam anemia grave com aumento do baço e deformidades dos ossos da face e do crânio. Destacaram um fato importante: as crianças tinham origem ancestral da região do mar Mediterrâneo, por serem de descendências italiana e grega. A partir desse relato, essa síndrome foi denominada por anemia de Cooley & Lee, mas constantemente referida apenas como anemia de Cooley. Alguns anos depois, devido à alta prevalência de relatos similares, principalmente na Itália e na Grécia, e também no Líbano, Tunísia, Argélia etc., esses casos de anemias graves passaram a

ser conhecidos como Anemia do Mediterrâneo. Mais tarde, durante o Congresso Internacional de Hematologia de 1940, um grupo de cientistas optou pelo termo **talassemia major**, onde, em grego, **thalassa** significa mar, e **anaima** falta de sangue. A adjetivação da gravidade inicialmente foi caracterizada pela palavra **major**, que significa maior. Posteriormente, com o aprofundamento dos estudos genéticos, passou-se a conhecer melhor as formas de transmissões hereditárias e os defeitos dos genes, e a forma grave foi denominada de talassemia beta homozigota; a talassemia **minor** ou menor, de heterozigota; e a talassemia intermédia foi definida por uma classificação muito mais clínica do que genética ou laboratorial.

A talassemia beta homozigota é, portanto, o resultado do estado homozigoto tanto do tipo β^+ quanto do tipo β^0 ou, em casos mais raros, de duplo componente heterozigoto β^+/β^0 . A ausência ou deficiência acentuada na produção de cadeias beta causa anemia grave devido à hemólise intramedular, bem como no baço. As crianças afetadas pela talassemia beta homozigota padecem de anemia no primeiro ano de vida, a partir do período em que o nível de produção de globina gama decresce, e não há a devida hemoglobinizacão pela diminuicão de síntese de globina beta, enquanto a globina alfa tem sua síntese normal. O resultado do desequilíbrio de síntese se manifesta por efeitos fisiopatológicos já descritos. A figura 8.20 mostra uma representacão gráfica das falhas do gene beta relacionados às talassemias menor e maior.



Herança Normal de Genes Beta

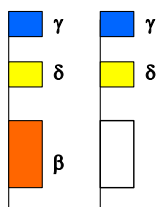
Herança de complexos gênicos beta normal proveniente um do pai e outro da mãe.

As combinações com globinas alfa resultam em:

Hb A ($\alpha_2\beta_2$) com 96 a 98% de concentração

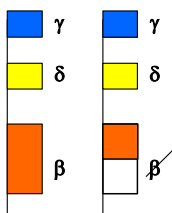
Hb A₂ ($\alpha_2\delta_2$); 2 A 4%

Hb Fetal ($\alpha\gamma_2$): 0 a 1%



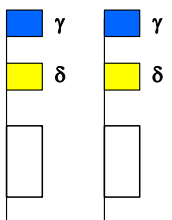
Talassemia β^0 menor

Neste caso um dos pais transmitiu a herança de complexo gênico normal e o outro transmitiu o complexo gênico com falha total no gene beta. A anemia pode ser discreta a moderada, com Hb A₂ geralmente elevada.



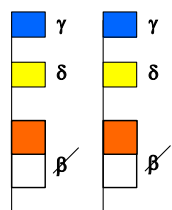
Talassemia β^+ menor

Um dos pais transmitiu o complexo gênico normal e o outro transmitiu o complexo gênico com falha parcial no gene beta. A anemia é discreta, com Hb A₂ geralmente elevada.



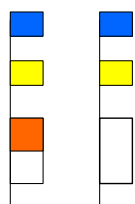
Talassemia β^0 maior

Herança de dois complexos gênicos com falha total no gene beta. A síntese de gene gama (Hb Fetal) tende a compensar a falha, porém sem sucesso para completar a hemoglobinizacão. A anemia é gravíssima (Hb: 3 a 4 g/dL) com 98% de Hb Fetal.



Talassemia β^+ maior

Herança de dois complexos gênicos com falha parcial no gene beta. Neste caso há discreta síntese de Hb A e de Hb Fetal, mas a anemia é grave (Hb: 5 a 7g/dL). A eletroforese mostra Hb AF.



Talassemia β^+/β^0 maior

Herança de dois complexos gênicos alterados, um com falha total e outro parcial. As consequências clínicas, genéticas e laboratoriais são semelhantes à tal. β^+ maior.

Figura 8.20: Representação gráfica de diversas possibilidades de falhas no gene beta do complexo gênico β , δ e γ como resultado de talassemias beta menor e maior.

Muitos dos doentes afetados morrem na infância ou na adolescência, podendo, entretanto, alcançar a terceira década, conforme a atenção médica e terapêutica recebidas. Destaca-se, porém, que as principais causas de óbito são infecções ou insuficiências cardíacas, devido à deposição de ferro no miocárdio. O acúmulo de ferro é decorrente da extensa e prematura destruição dos eritrócitos, tanto daqueles que são continuamente produzidos para suprir a anemia hemolítica, quanto dos recebidos em transfusões sanguíneas frequentes e necessárias, bem como da absorção gastrointestinal aumentada do ferro recebido pela dieta alimentar.

O padrão de hemoglobinas nos pacientes com talassemia beta homozigota é variável, caracterizando-se pelo aumento de Hb Fetal, com concentrações que variam de 20 a 90%. A Hb A₂ pode estar normal ou elevada e a Hb A aparece somente nos casos de deficiência parcial da síntese de cadeias beta. As crianças que não recebem tratamento adequado desenvolvem o quadro clínico típico da talassemia beta maior, que inclui, além da anemia grave, deformidades ósseas devidas à hiperplasia medular, hepatoesplenomegalia, pigmentação marrom da pele, distúrbios cardíacos e endócrinos, atraso no crescimento e na maturação sexual, infecções recorrentes e deficiência de ácido fólico. Por isso, para garantir a sobrevivência dos pacientes, é necessário o tratamento contínuo que consiste em transfusões sanguíneas regulares, que mantêm um nível de hemoglobina adequado e diminui a atividade da medula óssea, e no uso de quelantes do ferro, que auxiliam a eliminação do excesso desse metal no organismo. A tabela 8.5 resume as principais características laboratoriais que são comuns em pacientes com talassemia beta homozigota ou maior.

Tabela 8.5: Sinopse das alterações laboratoriais em doentes com talassemia beta maior.

Talassemia Beta Maior		
Características Laboratoriais		
[] Hb Fetal – 20 a 90%		
[] Anemia hemolítica microcítica e hipocrômica (Hb < 7g/dL)		
[] Morfologia eritrocitária:	anisocitose	poiquilocitose
	células em alvo	esferócitos
	formas bizarras	hipocromia
	células fragmentadas	
	siderócitos	eritroblastos
	pontilhados basófilos	anel de Cabot
[] Reticulócitos: aumentados		
[] Leucócitos: frequentemente elevados com desvio à esquerda		
[] Plaquetas: normais		
[] Ferro sérico e capacidade de transporte: elevada		
[] Ferritina: elevada		
[] LDH sérico: elevado		
[] Bilirrubina indireta: elevada (1 a 3mg/dL)		
[] Urobilinogênio na urina: elevado		
[] Sobrevida dos eritrócitos: diminuída		
[] Fragilidade osmótica: diminuída		
[] Fragilidade mecânica: aumentada		
[] Medula óssea: hiperplasia das células eritróides		

Talassemia beta heterozigota (menor)

O estado heterozigoto da talassemia beta é caracterizado geneticamente pela herança de um único componente alterado (figura 8.20). Nas formas β^0 e β^+ , a redução da taxa de síntese da globina beta é menor, mas o suficiente para causar discreto grau de anemia microcítica e hipocrômica com aumento de resistência osmótica dos glóbulos vermelhos. São indistinguíveis por exames laboratoriais de rotina (tabela 8.4), entretanto, com a utilização de técnicas de síntese de cadeias ou de

biologia molecular com sondas específicas de DNA, podem-se diferenciar esses heterozigotos.

Muitas vezes, a doença é mal diagnosticada e os pacientes são tratados inadequadamente, como se apresentassem anemia por deficiência de ferro. Laboratorialmente, as formas de talassemia β^0 ou β^+ caracterizam-se pelo aumento de Hb A (fig.8.21) cuja concentração varia de 4 a 7%, alterações morfológicas dos eritrócitos identificados especialmente por microcitose e hipocromia com muitos esquisócitos, dacriócitos e pontilhados basófilos (figura 8.22), resistência osmótica aumentada na solução de NaCl a 0,36%, diminuição da hemoglobina corpuscular média (HCM) e do volume corpuscular médio (VCM). A Hb Fetal pode estar normal ou discretamente aumentada. As manifestações clínicas, quando presentes, variam entre os diferentes grupos raciais, e entre elas podemos citar astenia, cansaço e baço palpável. A artrite também pode ser constatada na talassemia beta heterozigota. Os níveis de ácido fólico e vitamina B12 plasmáticas apresentam-se dentro dos limites normais em talassêmicos beta heterozigotos.

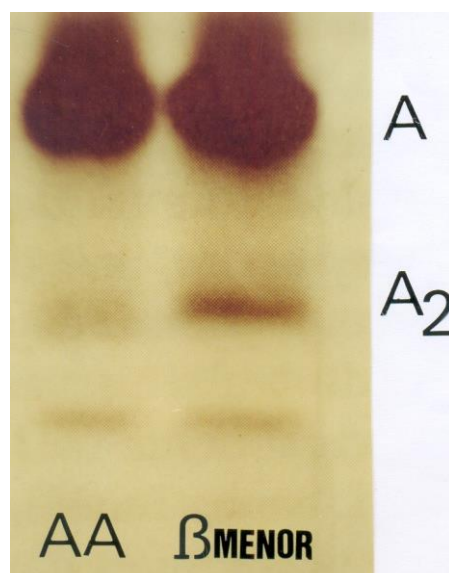


Figura 8.21: Hb A₂ aumentada em portador de talassemia beta menor, visualizada por meio de eletroforese alcalina (pH 8,5) em acetato de celulose em comparação com Hb AA e Hb A₂ normal.

De uma forma geral, a maioria dos portadores de talassemia beta, heterozigota apresentam padrões hematológicos que são coincidentes em 90% dos casos descritos na literatura:

VCM: (61 a 73) fl

HCM: (20 a 24) pg

Hb A₂: (4 a 7)%

Formas atípicas de talassemia beta heterozigota podem ocorrer, das quais os principais tipos são os seguintes:

Tipo 1 – talassemia beta heterozigota, com Hb A₂ aumentada, VCM e HCM normais.

Tipo 2 – talassemia beta heterozigota, com Hb A₂ diminuída, Hb Fetal discretamente elevada, VCM e HCM diminuídas. Esses casos são suspeitos de talassemia heterozigota beta-delta.

Tipo 3 – talassemia beta heterozigota, com Hb A₂ normal e VCM e HCM diminuídos. Esses casos são suspeitos da associação entre talassemia alfa e beta heterozigotas.

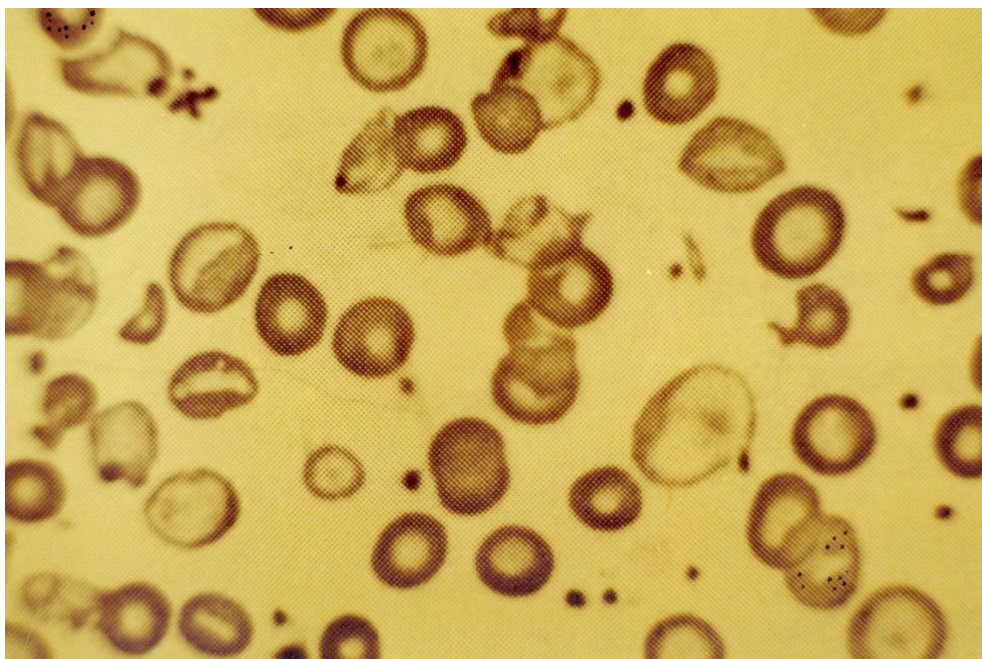


Figura 8.22: Morfologia eritrocitária típica de talassemia beta menor.

Talassemia intermédia

As formas clínicas denominadas por talassemia intermédia são aquelas resultantes de diferentes interações genéticas, cujos portadores apresentam quadro clínico mais ameno do que o da talassemia beta maior e não são dependentes de transfusão sanguínea. A talassemia beta intermédia pode decorrer da interação das talassemias alfa e beta, com redução concomitante e significativa de ambas as cadeias globínicas, o que diminui o número de cadeias desemparelhadas e propicia uma redução na taxa de destruição dos eritrócitos em comparação com as formas graves de talassemias. Entretanto a forma mais prevalente de talassemia beta intermédia se deve a lesões do tipo β^+ (β^+/β^+), cujo diagnóstico laboratorial somente é feito por biologia molecular. A talassemia beta intermédia pode decorrer também de manifestações da talassemia beta com alguns tipos de hemoglobinas variantes, particularmente a Hb E, Hb S e Hb C.

Interações entre talassemia beta e Hb variantes

As formas interativas mais frequentes entre talassemias beta e hemoglobinas variantes, no Brasil, são Hb S/beta talassemia e Hb C/beta talassemia. Há três formas principais de Hb S/beta talassemia: (a) Hb S/ β^0 talassemia, (b) Hb S/ β^+ talassemia tipo Mediterrâneo, (c) Hb S/ β^{++} talassemia tipo Negro.

A forma Hb S/ β^0 talassemia apresenta-se clinicamente parecida com a anemia falciforme, ou Hb SS, mas seus eritrócitos mostram os valores de HCM e VCM diminuídos. Na análise eletroforética a concentração de Hb S é variável entre 80 e 90%, a Hb Fetal está aumentada (até 20%), há ausência de Hb A, e a Hb A₂ está constantemente elevada. Para se efetuar um diagnóstico laboratorial seguro é importante a realização de exames nos pais dos portadores, que certamente se apresentarão como sendo um deles portador de talassemia

β heterozigota e outro de Hb S. Para melhor entendimento veja a figura 7.10, no capítulo 7 “Doença falciforme”.

A forma de Hb S/ talassemia β^+ Mediterrâneo é similar em gravidade à anemia falciforme, excetuando-se com relação às crises de falcização, que ocorrem com menor frequência, apresentando, entretanto, um hiperesplenismo que causa anemia mais proeminente. As alterações nos eritrócitos são características das talassemias e na análise eletroforética observa-se a presença de Hb A (15 a 30%), bem como Hb S, sempre com maior concentração que a Hb A. A Hb Fetal e Hb A₂ podem estar elevadas, sem ser regra geral. Para melhor entendimento veja as figuras 7.10 e 7.12, no capítulo 7 “Doença falciforme”. A forma Hb S/talassemia β^{++} tipo Africano é moderada, os portadores são menos anêmicos do que aqueles com a forma Mediterrânea. Os índices hematimétricos são parecidos com aqueles observados em talassêmicos heterozigotos. A análise eletroforética mostra a concentração de Hb A variável entre 25 e 30%, Hb S com níveis quantitativos superiores ao da Hb A, e hemoglobinas A₂ e Fetal com valores elevados.

As interações envolvendo Hb C e talassemia causam anemia hemolítica de grau moderado sem, entretanto, **com** as complicações apresentadas nas interações entre Hb S e talassemia beta.

Talassemia beta-delta

Essa talassemia é resultante da deficiência de ambas globinas beta e delta, que está associada à hemoglobinizacão deficiente dos eritrócitos.

A talassemia beta-delta no estado de homozigose produz quadro clínico semelhante ao verificado na talassemia intermédia. A Hb Fetal constitui 100% da concentração total da hemoglobina, devido à ausência de síntese das hemoglobinas A e A₂. A análise citológica dos eritroblastos, corados com solução supravital, mostra a presença de agregados de cadeias alfa, enquanto a fragilidade osmótica e a HCM estão diminuídas. A forma heterozigota, por sua vez, é caracterizada por níveis

normais ou diminuídos de Hb A₂, a Hb Fetal apresenta-se com valores variáveis entre 5 a 20%, a anemia é discreta e a HCM está diminuída na maioria dos portadores. A Hb Fetal está heterogeneamente distribuída entre os glóbulos vermelhos quando analisada em esfregaço submetido ao teste de eluição ácida, conforme mostra a figura 8.23.

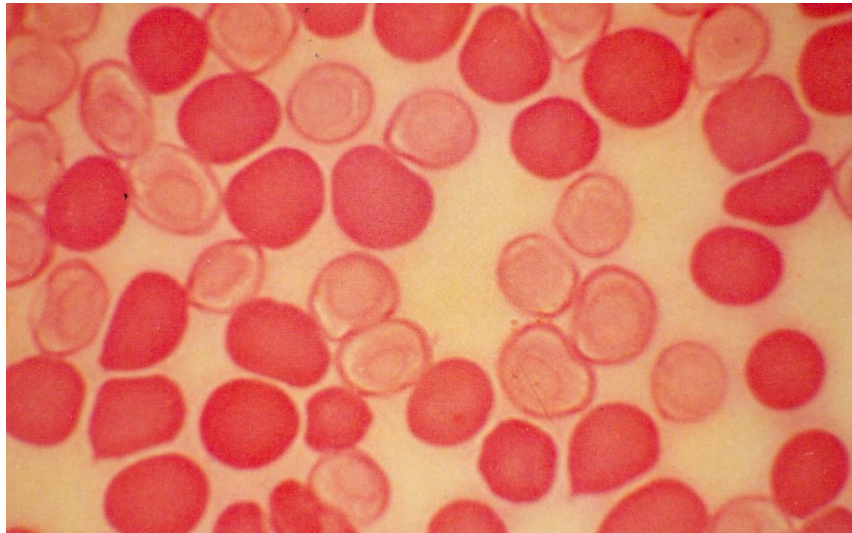


Figura 8.23: Distribuição heterogênea de Hb Fetal intra-eritrocitária. Esse teste citológico é usado para diferenciar o aumento da concentração de Hb Fetal que ocorre na persistência hereditária de Hb Fetal (distribuição homogênea) das talassemias beta maior e intermédia (distribuição heterogênea).

Associação entre talassemias beta e beta-delta

A heterozigose dupla para talassemias beta e beta-delta com Hb Fetal elevada é mais freqüente na Grécia. Os portadores dessa forma de talassemia têm anemia de gravidade intermediária, geralmente compensada sem transfusões. Entretanto, os sinais clínicos e a manifestação da anemia variam consideravelmente, e alguns pacientes podem ter hepatoesplenomegalia, anemia e osteoporose. Os pacientes padecem, ainda de predisposição à anemia hemolítica auto-imune. Os

resultados hematológicos são similares àqueles encontrados na talassemia beta homozigota, com graves alterações eritrocitárias, diminuição da HCM e da fragilidades osmótica, corpos de inclusão são compostos por agregados de cadeias alfa livre, alta concentração de Hb Fetal (50 a 90%) e Hb A₂ normal ou diminuída (figura 8.24). A distribuição da Hb Fetal intracelular é geralmente homogênea. O diagnóstico é confirmado por exames nos pais, um deles é heterozigoto para talassemia beta e outro para variante beta-delta com Hb Fetal elevada.

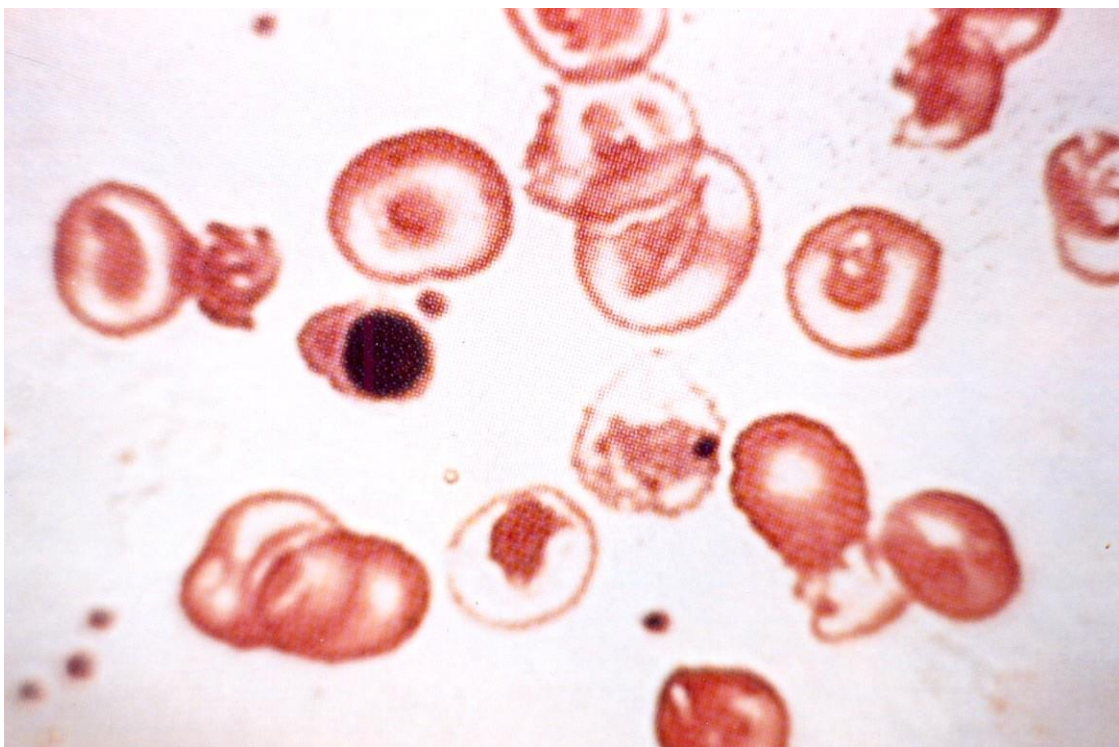


Figura 8.24: Esfregaço de sangue de paciente com anemia grave, típica de beta maior, mas que análises laboratoriais revelaram ter genótipo $\beta^0\delta/\beta^0\delta$. Hipocromia acentuada, eritroblastos, corpos de Howell-Jolly, etc.

Talassemia delta

Desde que a Hb A₂ representa somente uma menor fração da hemoglobina total, o desequilíbrio da síntese de cadeia delta não tem efeito significativo na morfologia dos glóbulos vermelhos e não tem importância clínica, a menos que esteja associada com outra hemoglobina

anormal. Na talassemia delta heterozigota espera-se uma diminuição da Hb A₂, enquanto nos homozigotos esta fração está totalmente ausente.

Persistência hereditária de Hb Fetal

A persistência hereditária da hemoglobina Fetal (PHHF) é um termo que abrange uma variedade de condições, todas associadas com a produção persistente de Hb Fetal após o período neonatal, com ausência de anormalidades hematológicas importantes. É incluída no capítulo das talassemias beta devido ao fato de o gene beta estar parcial ou totalmente bloqueado para a síntese de globina beta. Entretanto, na PHHF essa ação deletérea é compensada pela contínua síntese de Hb Fetal.

A classificação da PHHF pode ser resumida em dois grupos básicos: 1) o tipo Negro, e 2) o tipo Grego, que são formas mais freqüentes com distribuição homogênea de Hb Fetal intra-eritrocitária, e o tipo raro em que a persistência da Hb Fetal apresenta-se com distribuição heterogênea.

A associação entre PHHF e hemoglobinas variantes tem sido descrita notadamente em portadores de Hb S (Hb SF) e Hb C (Hb CF).

Nos portadores de PHHF/Hb S a falcização não ocorre facilmente, pois a Hb Fetal exerce em cada célula, uma ação protetiva contra a desoxigenação. Clinicamente os portadores dessa interação possuem eritrócitos com características falcizantes diferentes entre si (fato inverso ao que ocorre na anemia falciforme) e, dessa forma, os pacientes não têm infartos recorrentes e se tornam clinicamente parecidos com os portadores de Hb AS.

A associação entre PHHF e talassemia beta heterozigota provoca alta concentração de Hb Fetal associada com microcitose devido à talassemia. Nesse caso, o diagnóstico laboratorial torna-se difícil e confuso, por apresentar algumas características da talassemia beta homozigota. Entretanto, a condição clínica moderada, juntamente com o

estudo familiar, auxilia na diferenciação entre essa forma de interação e a talassemia beta homozigota.

Base molecular da talassemia beta

As talassemias beta constituem um grupo de alterações genéticas da síntese de hemoglobina extremamente diverso e que resulta na diminuição da globina beta. Clinicamente há grande variabilidade com relação a sintomas e manifestações, e essas condições são resultantes de fatores genéticos e adquiridos. A variabilidade clínica e hematológica sugere heterogeneidade genética, que é confirmada atualmente pela grande gama de mutações e alterações gênicas que originam as talassemias beta e cuja classificação pode ser realizada por análise de DNA. O complexo gênico das cadeias do tipo beta compreende uma extensão de aproximadamente 50Kb, incluindo os cinco genes funcionais e o pseudogene, e estão arrançados na seqüência 5'-3', na mesma ordem em que são ativadas durante as fases do desenvolvimento humano.

Mais de cem pontos de mutação causando talassemia beta foram bem caracterizados, resultando num déficit de cadeias beta que varia de mínima (alelo beta mais) à ausência completa (alelo beta zero). Heterozigotos, incluindo os portadores de alelos beta mais e beta zero, são clinicamente assintomáticos, ao passo que os homozigotos ou portadores de componentes heterozigotos associados apresentam sintomas evidentes, acompanhados de quadros hematológicos muito alterados e são dependentes de transfusão. Variações de ordens clínica e hematológica são observadas, conforme a origem racial do portador.

Grande parte das talassemias beta é determinada por mutações que afetam um pequeno número de pares de bases e interferem na transcrição, processamento, transporte, estabilidade e tradução do RNAm, ocorrendo também casos de variantes de cadeias polipeptídicas, dentre as quais podemos citar:

- A) Mutações que afetam a transcrição – concentram-se na substituição de nucleotídeos no “TATA box” e nas sequências CACACC distal e proximal, todos na região promotora 5’ do gene beta. Estão geralmente associadas a fenótipos moderados com início de transcrição reduzido. Variações étnicas dos fenótipos são observadas, sendo provavelmente influenciadas pela presença ou ausência de um nucleotídeo na região promotora. Amplificação gênica por PCR pode ser útil não só para o diagnóstico das talassemias, mas também para estudos de expressão gênica em nível transcricional, pois fornece taxas de RNAm específico 10 vezes maior do que o normal.
- B) Mutantes que alteram o RNAm – as mutações que afetam a estabilidade do RNAm podem estar tanto em alterações no capuz da extremidade 5’, como na região de clivagem do RNAm e no sinal de poliadenilação AATAA da extremidade 3’. As mudanças no capuz que alteram o primeiro resíduo, afetam a função do RNAm reduzindo a transcrição e retardando o processo de formação do capuz, alterando dessa forma a estabilidade do RNAm. Do mesmo modo, mutações na extremidade 3’, reduzem acentuadamente a clivagem do RNAm, produzindo moléculas mais longas e instáveis. Metodologias para determinação das taxas de RNAm fornecem novas e simplificadas formas de diagnóstico para as síndromes talassêmicas e avaliação da expressão gênica em nível transcricional.
- C) Mutações que afetam a tradução – a talassemia beta pode ser também originada por mutações sem sentido, que formam códons de terminalização na região codificadora interrompendo a tradução, e por mutações de sentido errôneo, originando códons para aminoácidos alternativos, como por exemplo, as Hb beta-Indianápolis e beta-Showa-

Yakishyi, com alterações nos aminoácidos 112 e 110, respectivamente. Essas cadeias são degradadas logo após sua síntese, devido à sua grande instabilidade, acarretando um estado muito similar ao produzido por redução de cadeias beta. Sete, dos 91 alelos, afetam a tradução do RNAm da globina, sendo tanto em relação às sequências sem sentido, que determinam a tradução, como em inserções, deleções e mutações “de novo”.

D) Deleções produzindo talassemia beta – um grande número de deleções afetando o gene beta da globina tem sido observado; muitas envolvendo os genes delta e beta simultaneamente, com alguns casos de PHHF e talassemia delta-beta. A deleção mais comum remove 619 pares de bases do íntron 2, do éxon 3 e da sequência 3, do gene beta. Outras possuem particular interesse, porque deixam o gene beta intacto com expressão silenciosa, mas são formas muito raras de serem identificadas.

Análise da Talassemia Beta por técnicas moleculares

Vários têm sido os métodos utilizados o diagnóstico das hemoglobinopatias pela análise do DNA, quer seja para a caracterização da mutação presente quer seja para o diagnóstico pré-natal.

O diagnóstico pré-natal das talassemias do tipo beta, alguns anos atrás, era possível através da amostra de sangue fetal colhida *in útero*, ou de células do líquido amniótico, sendo que este método apresentava alguns sérios inconvenientes, ou seja:

- A coleta era realizada somente a partir da 17ª semana da amenorréia, o que resultava, quando aconselhada, a interrupção da gravidez numa fase delicada e psicologicamente danosa para a mãe.

- A coleta e sua análise não poderiam ser realizadas, a não ser em grandes centros especializados pois, com efeito, o diagnóstico pré-natal das talassemias do tipo beta repousava sobre a evidência de uma

variação, quantitativa da síntese da cadeia beta globina. Isso exigia uma amostragem de pureza absoluta e análise do sangue fetal por eletroforese de focalização isoeletrica das hemoglobinas, além do estudo dos reticulócitos fetais para sintetizar *in vitro*, na presença de leucina triciada, cadeias de hemoglobinas.

A partir de 1982, foi possível realizar este diagnóstico pela análise do DNA de material trofoblástico colhidos entre a oitava e a 12ª semana da amenorréia, o que permitia, quando necessário, a interrupção da gravidez num estado precoce. Uma simples eletroforese desse material permitia reconhecer os casais de risco, mas, infelizmente, esse tipo de análise não informava com precisão a natureza do defeito molecular responsável pela doença, sendo que a maioria das mutações beta talassêmicas permaneceu por muito tempo inacessível por um diagnóstico direto, pois a utilização de oligonucleotídeos era possível unicamente em raros centros de estudo piloto. Por outro lado, as lesões moleculares que alteravam um sítio de restrição ou as grandes deleções facilmente detectáveis não eram comuns. Todavia, os genes beta talassêmicos podiam ser indiretamente evidenciados pela análise das ligações genéticas através dos marcadores RFLPs (polimorfismo dos diferentes fragmentos de DNA obtidos através de restrição enzimática) da região que contém os genes da globina da família beta. Mas, essa técnica dificulta o diagnóstico, pois ela impõe um completo estudo familiar algumas vezes impossível. Além disso, a necessidade de testar um grande número de enzimas de restrição, de utilizar diferentes e diversas sondas, com o propósito de evidenciar os RFLPs informativos, desestimulou consideravelmente este tipo de análise.

Assim, outros tipos de análises foram sendo testados com o intuito de se determinar a distribuição das mutações nos diferentes grupos étnicos. Isso permitiu, com o tempo, a aplicação de uma estratégia para o diagnóstico que evidenciasse a mutação em questão, sendo que as principais conclusões desses estudos foi o desenvolvimento e a introdução de uma metodologia muito promissora, a PCR ("polymerase chain

reaction”), que consiste na amplificação seletiva de um fragmento de DNA, permitindo obter-se uma multiplicação exponencial de uma sequência do DNA escolhida no meio da qual se encontra a mutação. O princípio do método consiste em utilizar dois oligonucleotídeos, construídos artificialmente, e que sejam complementares às extremidades escolhidas de uma determinada região onde ocorre a mutação, ou com sequência normal; e uma polimerase, a Taq polimerase. Após a amplificação, a mutação pode ser caracterizada por uma das técnicas atualmente em uso e na dependência das condições laboratoriais de cada centro de pesquisa. A ampliação permite igualmente determinar diretamente a sequência do DNA amplificado e o sítio de uma mutação.

Através destes estudos chegou-se às seguintes conclusões:

1. Foram catalogadas, até o momento, mais de 100 diferentes mutações do gene beta globina, sendo a grande maioria representada por mutações pontuais.
2. Existe, próprio de cada grupo étnico, um pequeno número de alelos específicos responsáveis por aproximadamente 90% das mutações talassêmicas, ou seja:
 - a) nas populações da região mediterrânea: códon sem sentido 39 (C → T) IVSI nt 110 (G → A), IVSI nt 6 (T → C), IVSI nt 1 (G → A) e IVSII nt 745 (C → G). Dois destes defeitos moleculares são responsáveis por perto de 60% dentre estas mutações, a β^0 e a β^+ 110 que predominam respectivamente a leste e a oeste da bacia do Mediterrâneo;
 - b) nas populações da Índia e do Paquistão: IVSI nt 5 (G → G), deleção de 619 pares de bases, “frameshift” 8-9, IVSI nt 1 (G → T) e “frameshift” 41-42;
 - c) nas populações chinesas e do sudeste da Ásia: “frameshift” 41-42, IVSI nt 654 (C → T), códon sem sentido 17 (A → T) e -28 (A → G);
 - d) entre os negros americanos: -29 (A → G), -88 (G → T) e códon 24 (T → A).

3. O Norte da África (Argélia e Tunísia) constitui um caso particular, pois os cinco defeitos moleculares mais frequentes no Mediterrâneo representam menos do que 50% das mutações. Além do mais, existe uma grande heterogeneidade molecular e várias mutações foram caracterizadas neste grupo étnico (IVSI nt 1 G → C, IVSI nt T → G, IVSI nt 2 T → C, IVSI nt 5 G → A e IVSI nt 843 C → A).

Desse modo, num primeiro plano, as mutações a pesquisar são funções da etnia do paciente e da natureza da talassemia, seja β^0 ou seja β^+ . Esta pesquisa, atualmente, é realizada após amplificação do gene beta; seja por digestão do produto da amplificação com determinadas enzimas de restrição; seja por hibridização com oligonucleotídeo alelo específico (ASO ou Dot Blot). Todavia, estas técnicas não são totalmente satisfatórias, pois a origem étnica dos pacientes, principalmente no Brasil, é muito variada, sendo necessário dispor de um grande número de oligonucleotídeos alelo específicos o que para alguns laboratórios é muito difícil devido aos altos custos. Este fator torna-se trabalhoso quando não se conhecem as mutações da etnia que se está analisando.

A sequência direta do produto amplificado pode ser uma boa alternativa, mas este método é de realização delicada e por consequência não é atualmente aplicável à rotina de um grande número de amostra.

Torna-se portanto indispensável um método simples, rápido, preferencialmente que não utilize material radioativo para a sua identificação e adaptável ao caráter de urgência que caracteriza o diagnóstico pré-natal. Uma metodologia que promete se tornar de grande valia, no que se refere a estes aspectos, é a análise por eletroforese em gradientes de desnaturação (DGGE) do produto de amplificação do gene beta globina e que permite colocar em evidência a maioria das mutações beta talassêmicas, sem prejudicar a sua natureza e a sua posição, mas podendo ser comparada aos perfis de mutações conhecidas.

Análise das mutações do gene beta por DGGE

Numa primeira etapa escolhe-se o segmento de DNA a analisar, como por exemplo, através de um programa informatizado de algoritmos que permite conhecer a carta de fusão do fragmento de DNA que corresponde à totalidade do gene beta globina desde a região do promotor até o sinal de poliadenilação. A partir desta carta de fusão, é possível definir a posição e a sequência de dois “primers” complementares (oligonucleotídeos construídos artificialmente) e que serão colocados para amplificadas partes escolhidas do gene beta globina. Esta amplificação com ajuda dos “primers” deve preencher três critérios de seleção:

1. Seu tamanho deve estar compreendido entre 500 e 1.000 pares de bases, sendo melhor analisar 500 ou menos pares de bases, pois a qualidade da resolução da eletroforese diminui quando fragmentos maiores são analisados.
2. Cada um deles deve conter, ao menos, dois domínios de fusão de estabilidade diferentes, permitindo que a posição final do gel destes diferentes fragmentos dependa exclusivamente da temperatura de fusão do domínio menos estável.
3. Cada parte do gene beta globina a pesquisar corresponde ao menos uma vez ao domínio estável do fragmento dado, sendo que isto permite analisar a totalidade do gene beta, e colocar em evidência a maioria das mutações responsáveis pelas talassemias do tipo beta.

Os “primers” que apresentam um só domínio de fusão e, portanto, se desnaturando em bloco numa determinada concentração de desnaturante, não permitem evidenciar as modificações do comportamento fusional ligado às variações das sequências nucleotídicas, podem ser acrescidos de sequências ricas em G e C (“GC-clamps”) adicionadas em 5’ de um dos “primers”, criando artificialmente um domínio de alta estabilidade não-desnaturável nas condições da

eletroforese, resultando com isso que cada um desses fragmentos possua, agora, dois domínios de fusão de estabilidades diferentes.

Desse modo, pode-se ter vários fragmentos e utiliza-los de acordo com uma estratégia específica para a pesquisa das mutações mais frequentes encontradas na dependência de etnia que se queira analisar.

Calcula-se que o DNA apresenta, em média, um polimorfismo para cada 500 pares de bases, sendo que estes polimorfismos, algumas vezes, transformam-se em excelentes marcadores para análises genéticas. Centenas deles foram mapeadas, em intervalos mais ou menos regulares, no genoma humano.

No gene beta globina, em especial, foram mapeadas cinco posições específicas definindo quatro sequências diferentes de nucleotídeos consideradas normais e que foram denominadas de "frameworks", ou conformação, ou estruturas, 1, 2, 3 e 3a, estas posições compreendem o último nucleotídeo do códon 2 e os nucleotídeos 16, 74, 81 e 666 do íntron II.

Os "frameworks" 1 e 2 diferem por um nucleotídeo na posição 74 do IVSII, sendo isso observado em todas as populações analisadas até o momento.

O "framework" 3 pode ser considerado como específico de populações mediterrâneas, sendo que possui cinco diferentes nucleotídeos com relação ao "framework" 1. Por sua vez, o "framework" 3a pode também ser observado em todas as populações, com exceção da população mediterrânea, sendo que difere em quatro posições em relação ao "framework" 1, e em apenas uma posição em relação ao "framework" 3.

Diagnóstico laboratorial das talassemias beta

Diferentemente do doente com talassemia beta homozigota (ou maior), que padece de anemia grave e outras situações clínicas, o portador da talassemia beta heterozigota (ou menor) é quase sempre

assintomático e fisiologicamente adaptado a essa situação. Assim, se há alguma dificuldade em se estabelecer o diagnóstico laboratorial com segurança, certamente esta situação ocorre entre os heterozigotos.

As características hematológicas dos portadores são idênticas nas diversas variedades de talassemia menor, sendo todos dependentes da redução da síntese de hemoglobina. De forma geral, algumas características são comuns a 90% dos talassêmicos heterozigotos:

- concentração de hemoglobina discretamente inferior ao valor normal para a correspondente faixa etária e sexo;
- aumento (compensatório) do número de eritrócitos, geralmente acima de $5,0 \times 10^6/\text{mn}$, que não corresponde ao volume eritrocitário (hematócrito), pois o empacotamento é composto por eritrócitos microcíticos e hipocrômicos;
- redução do volume corpuscular médio (VCM) pela não-correspondência entre os valores eritrocitários altos para hematócritos diminuídos; e redução da hemoglobina corpuscular média (HCM) pela escassa hemoglobinação;
- aumento da resistência globular osmótica, em solução de NaCl a 0,36%, devido à reduzida hemoglobinação e à leptocitose dos eritrócitos;
- alterações morfológicas dos eritrócitos, caracterizados principalmente por microcitose, hipocromia, esquizócitos, dacriócitos, leptócitos e pontilhados basófilos.

Portanto, para identificar a talassemia beta heterozigota há necessidade de análises específicas que distinguimos em três níveis (tabela 7.5).

Tabela 8.6: Análises laboratoriais para o diagnóstico das talassemias heterozigotas.

Primeiro nível
- índice eritrocitário (eritrócitos, Hb, VG, HCM, VCM, CHCM) - resistência osmótica eritrocitária em solução de NaCl a 0,36% - morfologia eritrocitária - análises qualitativas e quantitativas da Hb A₂ e Hb Fetal - dosagem de ferro sérico ou ferritina - análise dos familiares
Segundo nível
- análise de hemoglobinas por técnicas específicas, conforme cada caso.
Terceiro nível
- análise de DNA do fragmento do gene pretendido para estudo

Primeiro Nível:

Índices eritrocitários: atualmente são determinados quase exclusivamente com contadores automáticos de células do sangue.

Resistência globular osmótica eritrocitária: é um teste seletivo, realizado pela mistura de 5µl de sangue com 1ml de NaCl a 0,36%, e analisado qualitativamente. Os eritrócitos de 93% dos talassêmicos beta heterozigotos, pelas suas deformidades morfológicas, são resistentes à hemólise.

Morfologia eritrocitária: é um teste importante, que pode ser analisado em esfregaços não-corados, porém bastante finos. A morfologia eritrocitária dos talassêmicos beta heterozigotos é muito peculiar na maioria dos casos, com visível presença de microcitose e hipocromia.

Análises das hemoglobinas: são partes indispensáveis das análises do primeiro nível, pois permitem discriminar a maior parte das talassemias heterozigotas. Consiste essencialmente no estudo eletroforético das hemoglobinas e dosagens das hemoglobinas A₂ e Fetal. Para a dosagem de Hb A₂ sugerem-se dois métodos: 1. fracionamento eletroforético das hemoglobinas A e A₂, seguida de eluição em água destilada, e leitura espectrofotométrica; ou 2. fracionamento cromatográfico, também com

eluição das frações de Hb A e Hb A₂, e leitura espectrofotométrica. Os dois métodos são muito sensíveis e sua praticidade depende da opção do laboratório. A dosagem de Hb Fetal pode ser realizada pelo método da resistência alcalina (técnica de Betke), que permite a detecção desde traços de Hb Fetal até concentrações moderadamente altas ($\pm 20\%$).

Ferro sérico: é uma análise importante, especialmente para diferenciar a anemia ferropriva da talassemia beta heterozigota. Destaca-se que a presença da associação entre talassemia menor e a anemia ferropriva influi na dosagem de Hb A₂, diminuindo sua concentração (figura 8.25).

Análise dos familiares: é um complemento útil no diagnóstico laboratorial das talassemias (menor e maior), em especial para os casos duvidosos.

A figura 8.26 resume esquematicamente os testes básicos para o diagnóstico laboratorial das talassemias beta heterozigotas.

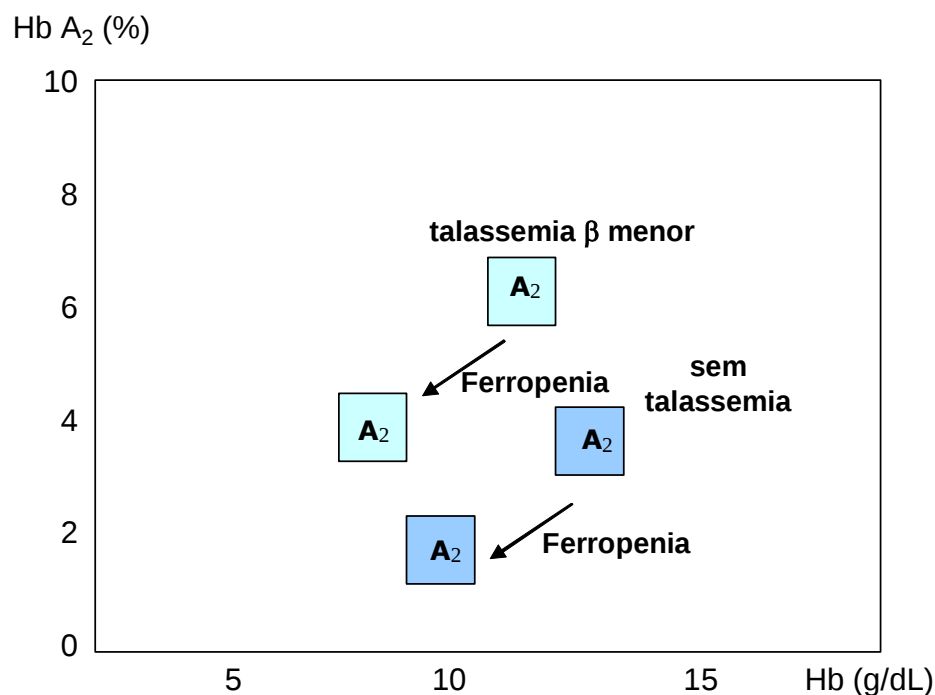


Figura 8.25: Gráfico relacionado a influência da anemia ferropriva na dosagem de Hb A₂, tendo como exemplo um caso com talassemia beta menor e outro sem talassemia.

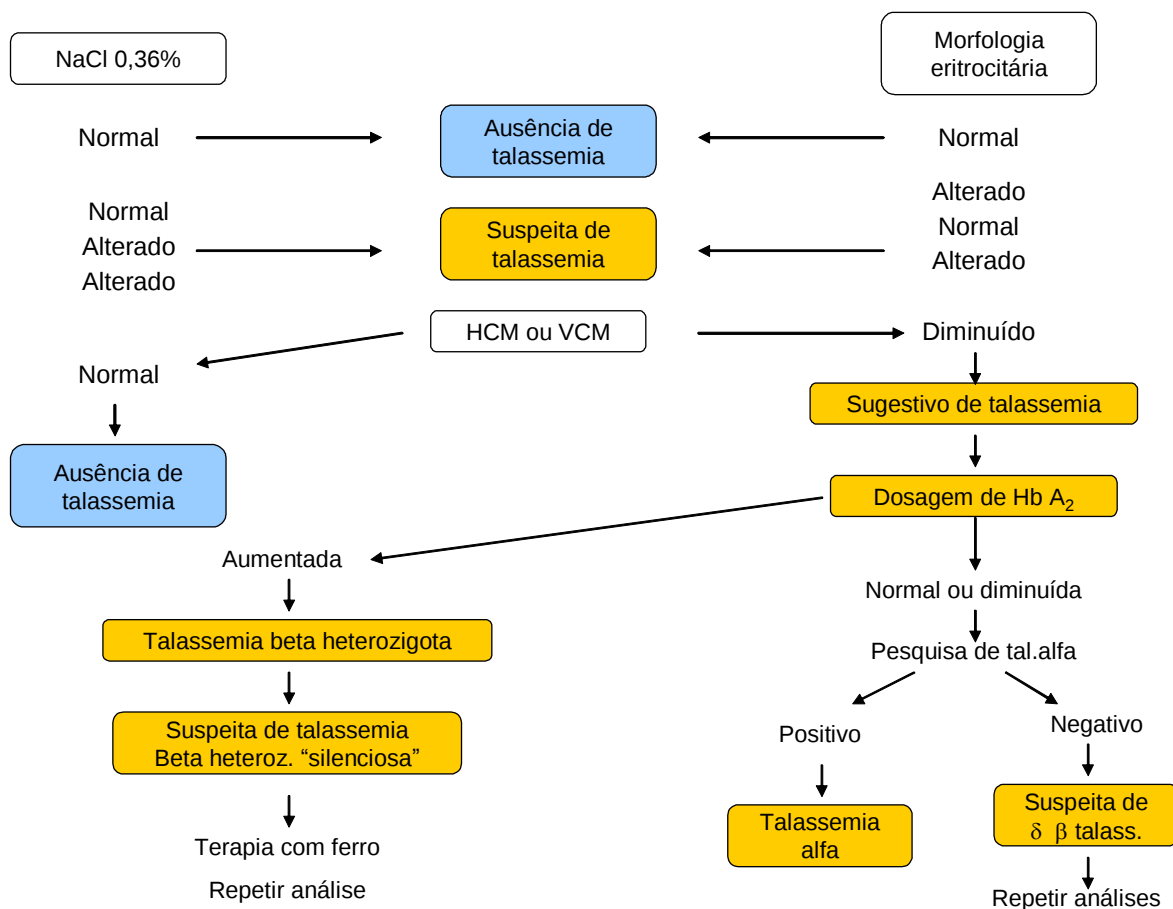


Figura 8.26: Sinopse em forma de esquema dos testes seletivos e específicos para talassemia.

Segundo nível

Análise de hemoglobina com técnicas específicas: a aplicação da técnica de eletroforese por isoeletrofocalização ocorre em casos muito específicos, com o objetivo de separar hemoglobinas variantes com fenótipos talassêmicos. O melhor exemplo da aplicação dessa técnica se refere à Hb Knossos, uma hemoglobina estruturalmente anormal, que ao se associar à talassemia beta heterozigota provoca a redução na síntese de RNAm para a globina beta. Essa hemoglobina variante não se evidencia por meio de técnicas comuns de eletroforese, necessitando da isoeletrofocalização. Entre as técnicas específicas incluem pesquisa de corpos de Heinz e raramente síntese de globina.

Terceiro Nível

Análise do DNA: o estudo do DNA é realizado por tecnologia molecular e tem sido aplicado no diagnóstico de talassemias que apresentam dificuldade de identificação pelas técnicas descritas nos primeiro e segundo níveis. É usada com muita frequência, também para estabelecer os pontos de mutações que ocorrem no complexo gênico beta, permitindo, dessa forma, a diferenciação molecular de diversos genótipos de talassemia beta.

Talassemia Silenciosa

A designação de **talassemia silenciosa** foi criada nos anos 60 do século passado para explicar situações em que o clínico tinha a certeza de que seu paciente era portador de talassemia menor (geralmente talassemia beta menor), porém os exames laboratoriais que eram usados como “marcadores” (dosagens da Hb A₂ e Hb Fetal) se apresentavam normais, mesmo com hemograma típico de uma talassemia beta menor, conforme mostra o exemplo abaixo:

Paciente: ACN, 14 anos, sexo masculino

GV: 5.600.000/mm ³	Eletroforese de Hb: AA
Ht: 38%	Dosagem de Hb A ₂ : 3,06%
Hb: 12,1g/dL	Dosagem Hb F: 0,7%
VCM: 67,8fl	_____
HCM: 21,6pg	Reticulócitos: 1,8%
CHCM: 31,8g/dL	_____
RDW: 17%	Morfologia eritrocitária:
	Microcitose e esquisócitos
	Hipocromia. Pontilhados basófilos

Pela análise dos exames do paciente observa-se que embora a contagem de glóbulos vermelhos, hematócrito e hemoglobinas estejam com valores normais, os índices VCM e HCM estão diminuídos e indicam microcitose e hipocromia. O índice RDW está aumentado e indica alterações na morfologia dos eritrócitos. A eletroforese de hemoglobina e dosagens de Hb A₂ e Hb Fetal estão normais.

Um caso similar a este nas décadas de 1970 e 1980 era encaminhado para a realização de um exame conhecido por síntese de globinas alfa e não-alfa (beta+gama+delta), cujo resultado para ser normal deveria ter uma relação igual a 1, ou seja:

$$\text{Síntese de Hb} = \frac{\text{alfa}}{\text{beta} + \text{gama} + \text{delta}} = 1$$

Se o paciente tivesse beta talassemia, a relação seria > 1 , pois haveria valores diminuídos de beta na quantificação dessa relação. A técnica de síntese usava os reticulócitos marcados com radioisótopos e a síntese de globina era avaliada por cromatografia. O método era caro e oferecia perigos por causa dos radioisótopos. A partir de 1980 foi substituído por biologia molecular.

Entretanto, na maioria dos casos a talassemia silenciosa pode ser identificada por meio de métodos usuais e disponíveis na maioria dos laboratórios, sem a necessidade de usar técnicas de biologia molecular, pelas seguintes razões:

- a - a maioria dos casos de talassemia silenciosa se deve ao fato de um paciente ter realmente talassemia beta menor porém tem associado anemia ferropriva. Na deficiência de ferro ocorre diminuição na síntese de Hb A₂.
- b - associação entre talassemia alfa e talassemia beta menor. Nesses casos o desequilíbrio entre as sínteses de globinas alfa e beta é menor e este fato diminui a percepção de que a Hb A₂ esteja aumentada em sua concentração.
- c - associação entre talassemias beta e delta. A diminuição da síntese de globina delta repercute na avaliação de Hb A₂, que se mostra com concentração normal ou até diminuída.
- d - talassemia alfa menor no qual o laboratório não conseguiu identificar a Hb H.

CAPÍTULO 9: HEMOGLOBINAS INSTÁVEIS

Co-autor: Flávio Augusto Naoum

Introdução

As hemoglobinas instáveis constituem um grupo de variantes genéticas de hemoglobinas em que a mutação de aminoácidos nas globinas alfa ou beta afeta a estrutura da molécula tornando-a instável. A avaliação da estabilidade da molécula de hemoglobina é realizada por métodos físico-químicos bem definidos atualmente, entre os quais destacam-se o aquecimento da solução de hemolisado entre 50 e 60°C, a incubação com isopropanol (HCl) a 37°C, ou a agitação vigorosa do tubo contendo o hemolisado. Assim, as hemoglobinas que precipitam mais rapidamente do que as normais são designadas instáveis.

Devido à grande diversidade dos pontos de mutações na estrutura globínica, bem como os tipos de mutações por substituições e deleções de aminoácidos, as formas de instabilização se apresentam muito variadas. Devido a essa situação, algumas hemoglobinas são discretamente instáveis e não estão associadas com sintomas clínicos, enquanto outras hemoglobinas instáveis se precipitam com grande intensidade, causando anemias hemolíticas. Essas anemias podem ser graves, com acentuada diminuição dos níveis de hemoglobina e reticulocitose muito elevada, ou, então, podem apresentar-se com discreto quadro hemolítico acompanhado por modesta reticulocitose.

Uma das principais características das hemoglobinas instáveis que causam anemia hemolítica é a presença de corpos de inclusões eritrocitários conhecidos por corpos de Heinz. Os corpos de Heinz normalmente não são visualizados nos eritrócitos circulantes, a não ser que o portador tenha sido esplenectomizado, mas podem ser detectados quando os eritrócitos são incubados com corantes indutores, por exemplo, azul de cresil brilhante. Em geral, o grau de instabilidade da hemoglobina

instável está relacionado com a produção de corpos de Heinz e com a gravidade da anemia.

Desde 1964, quando Grimes, Meisler e Dacie descreveram a primeira hemoglobina instável, cerca de 300 variantes diferentes foram estruturalmente caracterizadas, muitas das quais causadas por mutações recentes, ou “fresh mutations”, sem apresentarem história familiar.

No Brasil o aparecimento de hemoglobinas instáveis não é incomum. Vários casos foram registrados em São Paulo, Rio Grande do Sul, Rio de Janeiro, Santa Catarina e em Manaus. Em nosso laboratório diagnosticamos 30 casos, entre os quais identificamos estruturalmente as Hb Koln, Santa Anna, Niterói, Gun Hill e Hasharon. Recentemente Bezerra e colaboradores descreveram duas novas hemoglobinas instáveis de origem brasileira, ambas com lesões moleculares na globina beta: a Hb Caruaru (Beta 122 Fen – Ser) e Hb Olinda (beta, com deleção dos aminoácidos 22 a 25). Os portadores dessas duas hemoglobinas variantes padecem de anemia moderada a grave, icterícia, hepato e esplenomegalia, e ocasionalmente necessitam de transfusões de concentrado de hemácias.

Bioquímica e Fisiologia das Hemoglobinas Instáveis

A estrutura tetramerizada da molécula de hemoglobina se mantém estável por meio de importantes ligações efetuadas por aminoácidos. Um desses pontos de contato ocorre entre as globinas dos tipos alfa e beta, ou $\alpha_1\beta_1$. Outro ponto de estabilização química é verificado na superfície interna da hemoglobina, e é exercido, notadamente, pelos aminoácidos que protegem o grupo heme da oxidação. Por outro lado, a própria estrutura tridimensional da hemoglobina, com forma helicóide, estabelece a configuração globular da hemoglobina e mantém os equilíbrios funcional e estrutural entre seus aminoácidos formadores. A substituição de qualquer um desses resíduos,

pertencentes a um dos três pontos estabilizadores, por outro de características físicoquímicas diferentes, por exemplo: tamanho, ponto isoelétrico e polaridade impossibilitarão a manutenção da integridade molecular. Essa desestabilização ocorrerá, inicialmente, pelo afrouxamento da sua estrutura, permitindo o acesso de água para o interior do grupo heme, oxidando-o. A esse processo segue-se a desintegração do tetrâmero, cujos polipeptídeos desagregados precipitam-se no interior dos eritrócitos sob forma de corpos de Heinz.

Fisiologicamente a instabilização da hemoglobina pode ser explicada como consequência de uma ligação anormal entre as cadeias alfa e beta, especialmente nos contatos $\alpha_1\beta_1$, e também pelo bloqueio do radical SH do aminoácido cisteína (Cis) que ocupa a posição 93 da cadeia polipeptídica beta. Supõe-se que as substituições de aminoácidos que participam da estabilização da molécula, e também daqueles que estão próximos do grupo heme, diminuem a atração da globina por seus hemes. Se esses processos ocorrerem na cadeia polipeptídica beta, os radicais SH reativos poderão ser afetados. A globina desprovida do heme é a principal responsável pela formação dos corpos de Heinz, os quais se fixam na membrana dos eritrócitos por duplas ligações de enxofre, alterando-lhe a permeabilidade e a osmose, provocando, conseqüentemente, a sua destruição precoce e a anemia. Os hemes livres, após terem sido metabolizados, transformam-se em pigmentos dipirróicos que, ao serem excretados pela urina, tornam-na escura.

Formação dos corpos de Heinz

A hemólise eritrocitária decorrente da formação dos corpos de Heinz é um fenômeno oxidativo.

Um fator comum das mutações instabilizantes se deve à alteração do meio em que o grupo heme está inserido. Três conseqüências advém desse processo: facilidade da hemoglobina em se oxidar,

diminuição da afinidade da globina pelo grupo heme e tendência da oxiemoglobina em se transformar em metaemoglobina, com o desencadeamento de eventos desnaturantes observados na figura 9.1.

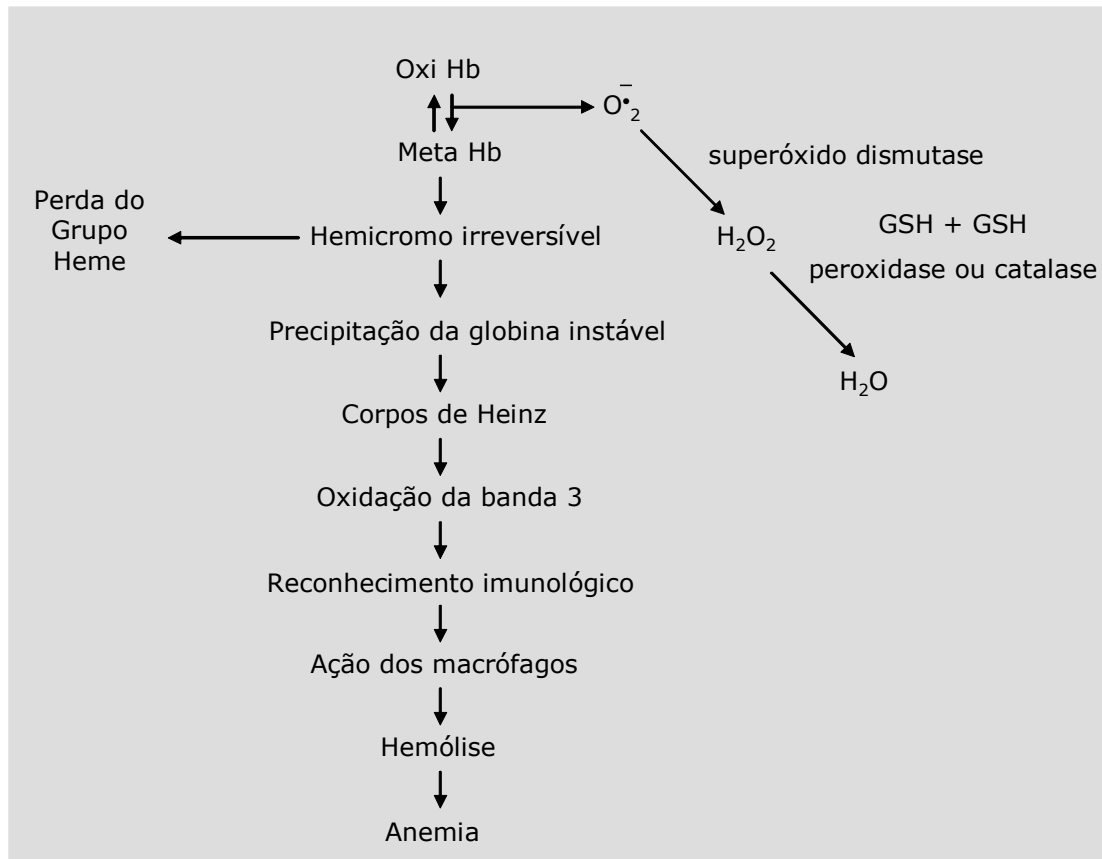
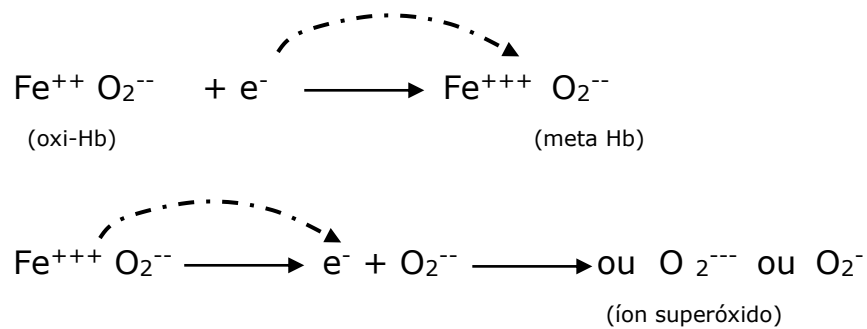


Figura 9.1: Seqüência de eventos no processo de oxidação das hemoglobinas instáveis.

A geração de corpos de Heinz se deve, portanto, a uma série de reações oxidativas que se inicia pela transformação da oxiemoglobina em metaemoglobina. Como se sabe, uma das mais importantes funções da globina é manter o grupo heme na forma reduzida. Para efetuar esse controle, no qual a água é totalmente impedida de penetrar no interior do grupo heme e, assim, não atingir o ferro, ocorre uma conformação estrutural do aminoácido que resulta no chamado “pacote de proteção do grupo heme” ou, simplesmente, “pacote do heme”. Dessa forma, mantém-se o ferro no estado ferroso (Fe^{++} ou $\text{Hb}^{++}\text{O}_2^{--}$).

A maioria das hemoglobinas instáveis tem propensão a se autooxidar em metaemoglobina, o que representa um valor de três a quatro vezes maior do que a Hb A. A formação de metaemoglobina envolve a transferência de elétrons do ferro do grupo heme, com liberação de radicais superóxidos:



Quando o grau de formação de metaemoglobina aumenta, como no caso das hemoglobinas instáveis, a metaemoglobina redutase não consegue reverter a situação, desfazendo o equilíbrio entre oxiHb e metaHb (figura 9.1). Como consequência desse desequilíbrio, a metaemoglobina origina subprodutos conhecidos por hemicromos e perde o grupo heme. Esses subprodutos de globinas instáveis e desprovidas do grupo heme se precipitam nos eritrócitos, sob forma de corpos de Heinz (figura 9.2). Os corpos de Heinz exercem efeitos deletérios às proteínas de membranas dos eritrócitos, causando oxidação da banda 3, fato que permite o reconhecimento imunológico pelos macrófagos do sistema retículo-endotelial do baço. A ação dos macrófagos, ao retirar por fagocitose os corpos de Heinz causa a deformação dos eritrócitos, resultando as células "mordidas", (figura 9.3), com consequente hemólise e anemia.

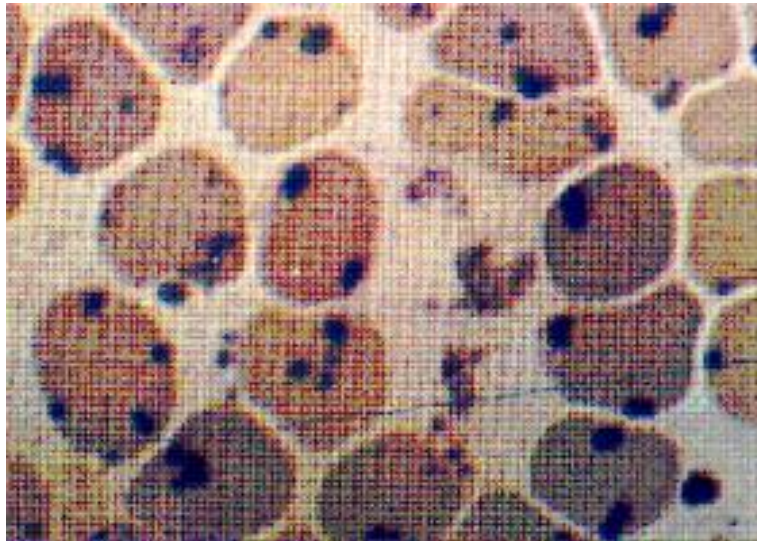


Figura 9.2: Eritrócitos com precipitados de corpos de Heinz em pessoa esplenectomizada com hemoglobina instável do tipo Koln.

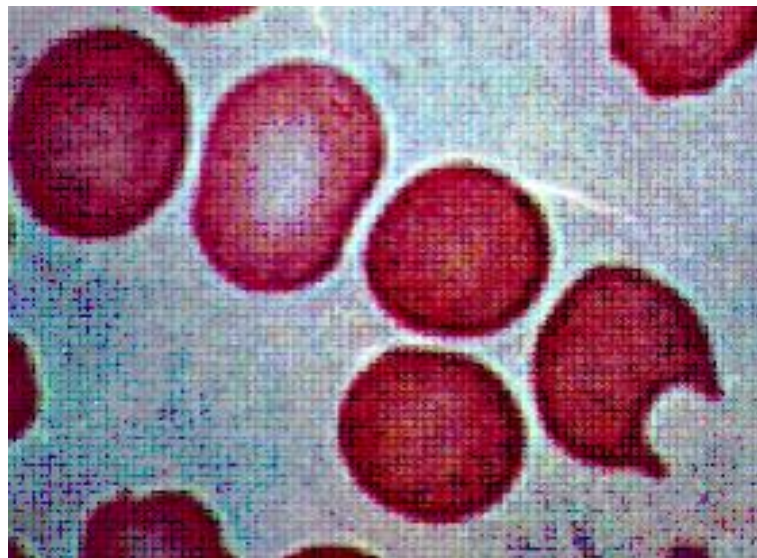


Figura 9.3: "Célula mordida" no sangue periférico de um portador de hemoglobina instável.

Oxidações e mecanismos de hemólise

Alguns trabalhos realizados com hemoglobinas instáveis demonstraram que a liberação do ferro, no processo de degradação da molécula de hemoglobina, contribui para estimular mais reações oxidativas. Na auto-oxidação das hemoglobinas instáveis ocorre a contínua geração de íons superóxidos e, conseqüentemente, aumenta a requisição de enzimas redutoras para equilibrar as atividades de oxidação-redução. O efeito quase imediato à ação oxidativa resulta no aumento da concentração das enzimas nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-reduzida (NADH); nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato-reduzida (NADPH), da metaemoglobina redutase, catalase, glutathione peroxidase e superóxido dismutase. Obviamente, o processo oxidativo nas hemoglobinas instáveis sobrepõe as reações das enzimas redutoras, apesar de estas estarem permanentemente com seus processos de sínteses elevados em comparação aos dos eritrócitos com hemoglobinas normais.

O mecanismo de hemólise que ocorre nos eritrócitos com hemoglobinas instáveis se deve, portanto, à ação de três fatores: 1). presença da hemoglobina desnaturada, 2). formação de corpos de Heinz, e 3). gerações de radicais livres provenientes do estresse oxidativo. Destes três fatores, credita-se aos corpos de Heinz como a principal causa da hemólise. Estudos da ultra-estrutura celular eritrocitária mostraram que as células contendo corpos de Heinz podem ser destruídas no baço ou fígado, ou terem seus corpos de Heinz seletivamente marcados por macrófagos (figura 9.4). Os eritrócitos com corpos de Heinz perdem sua plasticidade ao passarem pelos estreitos sinusóides do baço, tornando-se lentos e com dificuldades para atravessarem as paredes dos vasos. Esses fatores alteram sua mobilidade, permitindo a ação dos macrófagos e a sua precoce destruição.

As tabelas 9.1 e 9.2 apresentam as principais características laboratoriais e clínicas das hemoglobinas instáveis mutantes de globinas alfa e beta, respectivamente.



Figura 9.4: Fotomicrografia eletrônica de eritrócitos marcados por macrófagos. Observar as lesões de membranas causadas pela agregação de corpos de Heinz junto à proteína Banda 3.

Tabela 9.1: Algumas características laboratoriais, clínicas e moleculares das hemoglobinas instáveis por mutações de **globina alfa**.

Hb anormal		Características laboratoriais da Hb anormal							Alterações	
Mutação	Corpos de Heinz	Urina escura	Anemia	Desnat. ao calor	Posição em pH 8,6	Conc. %	Meta Hb	Outros dados	Clínicas	Moleculares
TORINO α 43 Phe $\rightarrow$ Val	+	$\pm$	+	+	$\sim$ A	8	+	—	Crises de hemólises após tratamento com sulfas e derivados	Oxidação do ferro por falta de proteção do grupo heme
HASHARON SEALY e SINAI α 47 ASP $\rightarrow$ His	—	—	—	$\pm$	$\sim$ S	14-20	—	—	Hemólise oculta	Substituição de aminoácido na superfície externa
L. FERRARI α 47 ASP $\rightarrow$ Glu	+(após 3 dias a 40°C)	—	$\pm$	+(55°C)	$\sim$ S	20	—	F.O.↑	Hemólise oculta Hepatomegalia Esplenomegalia	Substituição de aminoácido na superfície externa
ANN ARBOR α 80 Leu $\rightarrow$ Arg	—	—	+	+	$\sim$ A	13	—	—	Hemólise oculta	Substituição na superfície interna. Cadeia α é catabolisada rapidamente
GRADY (Dakar) α 115 ou 118 Inserção de 3 resíduos Glu—PHE—THR	—	—	—	+	$\sim$ J	8-15	•	O ₂ ↑	—	Inserção ocorre próximo ao contato $\alpha_1\beta_1$ da posição 117
BIBBA α 36 Leu $\rightarrow$ PRO	+	?	+	+	$\sim$ S	5	+	•	Crises de Hemólise	Substituição na superfície interna
ETOBICCKE α 84 SER $\rightarrow$ ARG	?	?	?	+	$\sim$ A	•	•	•	—	Substituição próxima a um local invariante da superfície externa
COLUMBIA α 47 ASP $\rightarrow$ Gly	?	?	?	+	$\sim$ A	•	•	•	—	Substituição de aminoácido na superfície externa

F.O. = Fragilidade osmótica; O₂ = Afinidade ao oxigênio; + = presente; — = Ausente; ↑ = aumentado; ↓ = diminuído; • = sem informações; ? = pode ocorrer

Tabela 9.2: Algumas características laboratoriais, clínicas e moleculares das hemoglobinas instáveis por mutações de **globina beta**.

Hb anormal		Características laboratoriais da Hb anormal							Alterações	
Mutação	Corpos de Heinz	Urina escura	Anemia	Desnat. ao calor	Posição em pH 8,6	Conc. %	Meta Hb	Outros dados	Clínicas	Moleculares
SAVANNAH β Glu $\rightarrow$ Val	+	?	+	+	$\sim$ A	•	–	G-6-PD $\uparrow$	Hepatomegalia Discreta anemia hemolítica crônica	Substituição de aminoácido em local invariante da superfície interna; afeta o contato $\alpha_1\beta_1$
VOLGA β 28 Ala $\rightarrow$ Asp	+	?	+++	+	$\sim$ A	15-20	–	–	Acentuada anemia hemolítica crônica	Substituição de aminoácido em região hidrofóbica da molécula
GENOVA β 28 Leu $\rightarrow$ Pro	+	+	+++	+	$\sim$ A	25	–	–	Acentuada anemia hemolítica crônica	Substituição de aminoácido na região interna, não-polar da molécula
TACOMA β 30 Arg $\rightarrow$ Ser	–	–	$\pm$	+	$\sim$ A	?	–	O ₂ $\uparrow$	–	A substituição de aminoácido ocorre no contato $\alpha_1\beta_1$
A.LINCOLN (Perth) β 32 Leu $\rightarrow$ Pro	+	+	+++	+	Difuso $\sim$ A	16-20	+	G-6-PD $\uparrow$ O ₂ $\uparrow$	Acentuada anemia hemolítica crônica. Hipoplasia medular	Substituição de aminoácido na região interna, não-polar da molécula
PHILLI β 35 Tyr $\rightarrow$ Phe	+	–	$\pm$	+	$\sim$ A	?	+	pH 6,2	Esplenomegalia	A substituição de aminoácidos não ocorre no contato $\alpha_1\beta_1$
MEQUON β 41 Phe $\rightarrow$ Tyr	+	+	+++	+	$\sim$ A	?	–	2,3DPG $\downarrow$	Acentuada anemia hemolítica crônica. Fadiga	A substituição de aminoácidos na região do “pacote” do grupo heme
HAMMERSMTH β 42 Phe $\rightarrow$ Ser	+	+	+++	+	$\sim$ A	30	–	O ₂ $\downarrow$	Cianose. Acentuada anemia hemolítica crônica	Substituição de aminoácido na região do “pacote” do grupo heme
LOUISVILLE (Bucaresti) β 42 Phe $\rightarrow$ Leu	+	?	++	+	$\sim$ A	?	–	O ₂ $\downarrow$	Moderada anemia hemolítica	Idem ao anterior. Tendência a desnaturação por agentes bloqueantes do grupo sulfidril.

Tabela 9.2: (continuação).

Hb anormal		Características laboratoriais da Hb anormal							Alterações	
Mutação	Corpos de Heinz	Urina escura	Anemia	Desnat. ao calor	Posição em pH 8,6	Conc. %	Meta Hb	Outros dados	Clínicas	Moleculares
OKALOOSA β 48 Leu → Arg	—	?	±	+	~ S	34	—	O ₂ ↓	Nenhum	Substituição de aminoácidos na região externa, não-polar da molécula.
DUARTE β 62 Ala → Pro	+	+	Eritrocitose	+	~ A	?	—	O ₂ ↑	Icterícia	Substituição de aminoácidos na região externa, participante da manutenção da hélice E, cujos resíduos estão em contato com o grupo heme.
ZURIQUE β 63 Hys → Arg	+	+	±	+	~ F	25	+	O ₂ ↑	Anemia hemolítica crônica por indução de sulfonamidas	Substituição de aminoácido na superfície interna influi na integridade do grupo heme.
SYDNEY β 67 Val → Ala	+	+	+++	+	C/S	15	—	—	Acentuada anemia hemolítica crônica	Substituição de aminoácido na superfície interna influi na integridade do grupo heme.
BRISTOL β 67 Val → Asp	+	?	++	+	~ A	36	—	O ₂ ↓	Moderada anemia hemolítica crônica	Substituição de aminoácido deforma o “pacote” do grupo heme.
SHEPHERDS BUSH β 74 Gly → Asp	+	?	+	+	K/J	24	?		Anemia hemolítica crônica e hemoglobinúria por indução de sulfonamidas	Substituição do ácido deforma o “pacote” do grupo heme.
SEATTLE β 76 Ala → Glu	+	+	+	+	~ J	43	+	O ₂ ↓	Anemia hemolítica crônica	Interação anormal entre o Glu substituído e a His, nº 77, com repercussão na interação heme-heme.
BUENOS AIRES β 85 Phe → Ser	+	+	+	+	Difuso ~C	2-5	+	O ₂ ↑	Icterícia, anemia hemolítica crônica, esplenomegalia	Substituição do aminoácido na região interna, alterando a estrutura do “pacote” do grupo heme.

Tabela 9.2: (continuação).

Hb anormal		Características laboratoriais da Hb anormal							Alterações		
Mutação	Corpos de Heinz	Urina escura	Anemia	Desnat. ao calor	Posição em pH 8,6	Conc. %	Meta Hb	Outros dados	Clínicas	Moleculares	
BORAS β 88 Leu $\rightarrow$ Arg	+	?	+	+	~ L	10	+	—	Dores, anemia hemolítica crônica	Substituição de aminoácido na região invariante da superfície externa, mas que afeta o grupo heme.	
SANTA ANA β 88 Leu $\rightarrow$ Pro	+	+	+	+	~ L	10	—	—	Anemia hemolítica crônica	Idem ao anterior	
SABINE β 91 Leu $\rightarrow$ Pro	+	—	+++	+	~ S	7-10	+	F.O.↑	Anemia hemolítica crônica acentuada	Substituição do aminoácido causa a perda de contato hidrofóbico com o grupo heme.	
NEWCASTLE β 92 His $\rightarrow$ Pro	+	?	+	+	~ S	17	—	—	Anemia hemolítica crônica	Substituição do aminoácido ocorreu na superfície interna não-variante, alterando o grupo heme.	
KÖLN β 98 Val $\rightarrow$ Met	+	+	+	+	S/F	10-20	+	G-6-PD↑ F.O.↓ O ₂ ↑	Anemia hemolítica crônica Esplenomegalia	A substituição de aminoácidos causou deformação no grupo heme.	
RUSH β 101 Glu $\rightarrow$ Gln	—	?	+	+	~ A pH 8,0 S/A	35	—	G-6-PD↑	Anemia hemolítica crônica	Substituição de aminoácido no contato $\alpha_1\beta_1$	
SOUTHAMPTON (Casper) β 106 Leu $\rightarrow$ Pro	+	+	+++	+	~ A	40	+	G-6-PD↑	Esplenomegalia Anemia hemolítica acentuada	A substituição de aminoácido alterou o “pacote” do grupo heme.	
PETERBOROUGH β 111 Val $\rightarrow$ PHE	+	?	++	+	~ A	67 + Hb Lepore	—	O ₂ ↓	Anemia hemolítica acentuada após indução com sulfonamida	Idem ao anterior	

Tabela 9.2: (continuação).

Hb anormal		Características laboratoriais da Hb anormal							Alterações	
Mutação	Corpos de Heinz	Urina escura	Anemia	Desnat. ao calor	Posição em pH 8,6	Conc. %	Meta Hb	Outros dados	Clínicas	Moleculares
KHARTOUM β 124 Pro $\rightarrow$ Arg	—	+	+	+	~ S	30	—	—	Anemia hemolítica crônica	Substituição de aminoácido no contato $\alpha_1\beta_1$.
WIEN β 130 Tyr $\rightarrow$ Asp	+	+	$\pm$	+	~ A	10	—	—		Substituição de aminoácido na superfície interna.
LEIDEN β 6 ou 7 $\rightarrow$ 0	+	+	++	+	~ A	30	—	—	Hemólise crônica moderada e aguda	A deleção ocorreu na superfície externa.
FREIBURG β 23 Val $\rightarrow$ 0	+	+	+	+	~ F	30	+	O ₂ ↑	Cianose Discreta anemia hemolítica crônica	“Crossing-over” intragênico desigual destruiu a tríple base nitrogenada que codifica a Val.
NITERÓI β 42-44 $\rightarrow$ 0 (Phe, Glu, Ser)	+	+	++	+	C/S	10-15	—	—	Esplenomegalia moderada. Anemia hemolítica crônica.	Mutação envolveu a destruição da codificação de três aminoácidos em região interna invariável da molécula.
GUN HILL β 91-97 $\rightarrow$ 0	—	—	—	+	~ C	10	—	—	Nenhuma	Mutação envolveu a destruição da codificação de sete aminoácidos em região interna variável e em contato $\alpha_1\beta_2$.
LESLIE β 131 Gln $\rightarrow$ 0	+	+	+++	+	~ F	10-30	—	O ₂ ↓	Esplenomegalia. Anemia hemolítica acentuada	A deleção ocorreu no contato $\alpha_1\beta_1$ com alteração no “pacote” do grupo heme.
TUCHIGI β 56-59 $\rightarrow$ 0	+	+	+	+	~ A	20	+		Icterícia	Mutação envolveu a destruição de 4 aminoácidos na região interna da molécula afetando o contato $\alpha_1\beta_1$ do resíduo 55.

F.O. = Fragilidade osmótica; **O₂** = Afinidade ao oxigênio; + = Grau leve; ++ = Grau moderado; +++ = Grau acentuado; - = Ausente; ↑ = Aumentado; ↓ = Diminuído.

Características gerais das hemoglobinas instáveis

A principal evidência laboratorial das hemoglobinas instáveis é sua reduzida estabilidade quando submetidas ao calor de 50 a 60°C. A instabilidade é variável entre os diferentes tipos de hemoglobinas instáveis, com manifestações discretas de floculação até intensa precipitação. Exemplos importantes são a Hb E e a Hb S que dão reações discretamente positivas ao serem submetidas aos testes de calor e ao isopropanol. Apesar de essas hemoglobinas terem um pequeno grau de instabilidade, o termo hemoglobinas instáveis deverá ser reservado àquelas hemoglobinas que produzem corpos de inclusões de Heinz em pacientes com anemias hemolíticas agudas ou crônicas.

Outras características das hemoglobinas instáveis são as seguintes:

1. originam-se de mutações que envolvem substituições de aminoácidos em regiões muito sensíveis da molécula, cujo equilíbrio da composição química é imprescindível na sua estabilização e viabilidade fisiológica;
2. todas as formas descritas até o presente são heterozigotas;
3. estão associadas a anemias hemolíticas crônicas ou agudas, de variável intensidade: discreta, moderada ou grave;
4. a anemia pode ser induzida por alguns medicamentos, especialmente aqueles com compostos oxidantes e sulfonados, ou por processos infecciosos, por exemplo: após gripe, infecção bacteriana, etc.;
5. os corpos de Heinz não são visualizados em eritrócitos sem prévia coloração vital, a não ser em pacientes esplenectomizados;
6. o grupo heme se desnatura *in vivo* produzindo a excreção urinária de dipirróis, tornando-a escura;
7. o ferro é oxidado para o estado férrico, formando a metaemoglobina, cuja concentração é variável para um mesmo portador, em diferentes épocas de análise;

8. a labilidade molecular causada pelo tipo de mutação torna a hemoglobina instável facilmente desnaturável ao calor;
9. quando a mutação ocorre na cadeia beta, há liberação de cadeias alfa que podem ser observadas em eletroforeses de acetato de celulose, ou gel de amido, próximas ao ponto de aplicação;
10. geralmente os pais de portadores dessa anemia hemolítica não apresentam hemoglobinas instáveis, porém numa história bem feita é possível extrair dados importantes que podem explicar o aparecimento dessas formas de hemoglobinopatias.

Diagnóstico laboratorial

O diagnóstico laboratorial das hemoglobinas instáveis deve ser realizado utilizando-se técnicas específicas de desnaturação ao calor a 50 e 60°C, desnaturação pelo isopropanol-HCl a 37°C, pesquisa citológica de corpos de Heinz e eletroforese qualitativa de hemoglobinas em pH alcalino. Outras técnicas auxiliares devem ser aplicadas quando convenientes e necessárias, entre as quais destacamos as dosagens de metaemoglobina, a Hb A₂, e da fração alterada. É importante enfatizar que o diagnóstico laboratorial das hemoglobinas instáveis deve ser processado cuidadosamente, uma vez que a diversidade polimórfica, juntamente com as manifestações clínicas e laboratoriais desses tipos de alterações, são muito amplas.

Hematologicamente observa-se o seguinte:

1. **Eritrócitos** – variável de 1,5 a 4,0 x 10⁶/mm³. O tempo de sobrevivência dos eritrócitos está sempre diminuído, mesmo nos períodos intercrises hemolíticas.
2. **Hemoglobinas** - diminuição do teor das hemoglobinas é constante, e difere entre os portadores de uma mesma mutante. Em geral, a média verificada é próxima de 10g/dL, com dosagens

mínimas situadas entre 3 e 5g/dL nos períodos de crises hemolíticas.

3. **Hemoglobina corpuscular média** – diminuída devido à continua formação de corpos de Heinz.
4. **Volume corpuscular médio** – geralmente normal.
5. **Reticulócitos** – frequentemente aumentados, variando de 3 a 15% na maioria dos portadores de hemoglobinas instáveis, e de 50 a 75% em pacientes com hemoglobinas Southampton, Sabine, Savannah e Abraham Lincoln. Inclusões semelhantes aos da Hb H podem estar presentes na maioria dos pacientes com esse tipo de hemoglobinopatias.
6. **Morfologia eritrocitária** – é comum a anisopoiquilocitose, pontilhados basófilos e policromatofilia, com diferentes graus de intensidades entre os portadores de hemoglobinas instáveis.
7. **Leucócitos** – valores qualitativos e quantitativos normais.

Metodologia laboratorial específica

As técnicas específicas mais sensíveis para o diagnóstico laboratorial desse grupo de hemoglobinas anormais são as seguintes:

1. **Desnaturação ao calor** – a maioria dessas variantes apresenta positividade nos testes de termolabilidade a 5 e 60°C.
2. **Desnaturação em solução de isopropanol** – HCl a 37°C.
3. **Pesquisa de corpos de Heinz** – esses corpos de inclusões são formados espontaneamente em sangue periférico de pacientes com hemoglobinas instáveis submetidos à esplenectomia. Entretanto, os corpos de Heinz podem ser visualizados no sangue periférico após incubação com corantes redox (azul de cresil brilhante, fenilidrazina) nos pacientes não-esplenectomizados.
4. **Eletroforese em pH alcalino (8,0 a 9,0)** – cerca de 50% das hemoglobinas instáveis descritas apresentam mobilidade

semelhante à da Hb A. Esse fato ocorre principalmente quando a mutação envolve aminoácidos sem cargas, especialmente entre os do tipo hidrofóbico localizados na superfície interna da molécula de hemoglobina. Em hemolisados preparados com agentes hemolisantes, por exemplo: saponina a 1%, é possível observar frações difusas de heme desagregados na posição padrão da Hb S (figura 9.5). Nas mutantes de cadeias beta é comum a presença de cadeias alfa livres próximas ao local de aplicação da amostra (figura 9.6). A fração de uma hemoglobina instável é quase sempre difusa, e a concentração, embora muito diversa (2 a 40%), não guarda relação com o grau de anemia. A Hb A₂ está constantemente aumentada, notadamente nas mutantes de cadeias beta, cujo fato decorre da grande estabilidade dessa hemoglobina, que se sobressai diante da constante desnaturação da hemoglobina instável. Polímeros de hemoglobinas instáveis podem ser detectados em alguns casos (figura 9.7).

5. **Dosagem de metaemoglobina** – o aumento de metaemoglobina tem sido verificado em cerca de 30% dos portadores de hemoglobinas instáveis, devido à contínua oxidação do ferro. A sua concentração pode alcançar níveis de 30 a 40%.

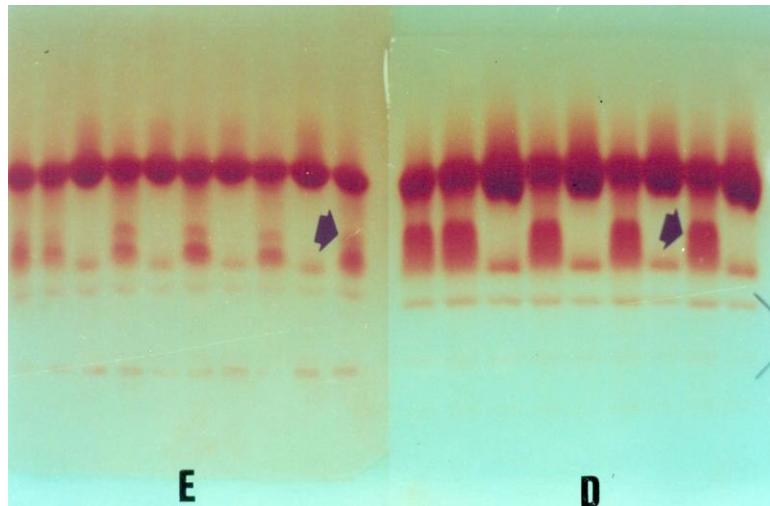


Figura 9.5: Eletroforese alcalina (pH 8,5) em acetato de celulose de uma família com hemoglobina instável. A imagem da esquerda (E) mostra hemolisados preparados com saponina a 1%. A imagem da direita (D), na mesma seqüência de aplicação, mostra as hemoglobinas obtidas de solução de hemoglobina preparada com clorofórmio. As setas indicam a região da hemoglobina instável numa dessas amostras.

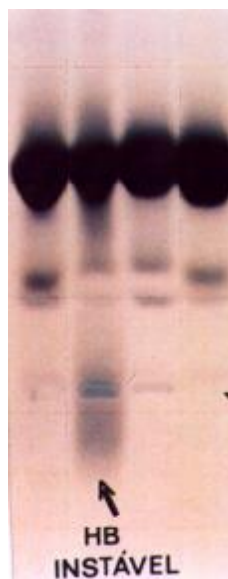


Figura 9.6: Eletroforese alcalina (pH 8,5) em acetato de celulose. Da esquerda para a direita: Hb AA, Hb A + Hb Instável com cadeia alfa livre, obtida de hemolisado com saponina a 1%; Hb A + Hb Instável obtida de extração com clorofórmio; e Hb AA. A única similaridade entre as duas hemoglobinas instáveis é a posição de Hb A₂, um pouco adiante de Hb A₂ normal.

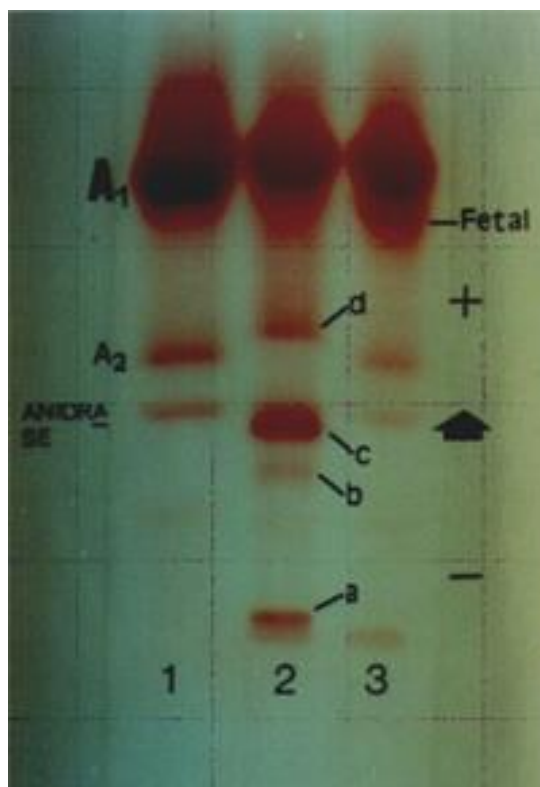


Figura 9.7: Eletroforese alcalina (pH 8,5) em acetato de celulose. (1) Hb AA; (2) Hb A + Instável com polímeros lentos: a, b, c e a posição da Hb A₂ alterada (d); (3) Hb A + Fetal elevada.

Outras informações:

Cerca de 35% das hemoglobinas instáveis apresentam alterações na afinidade ao oxigênio, sempre associada à anemia.

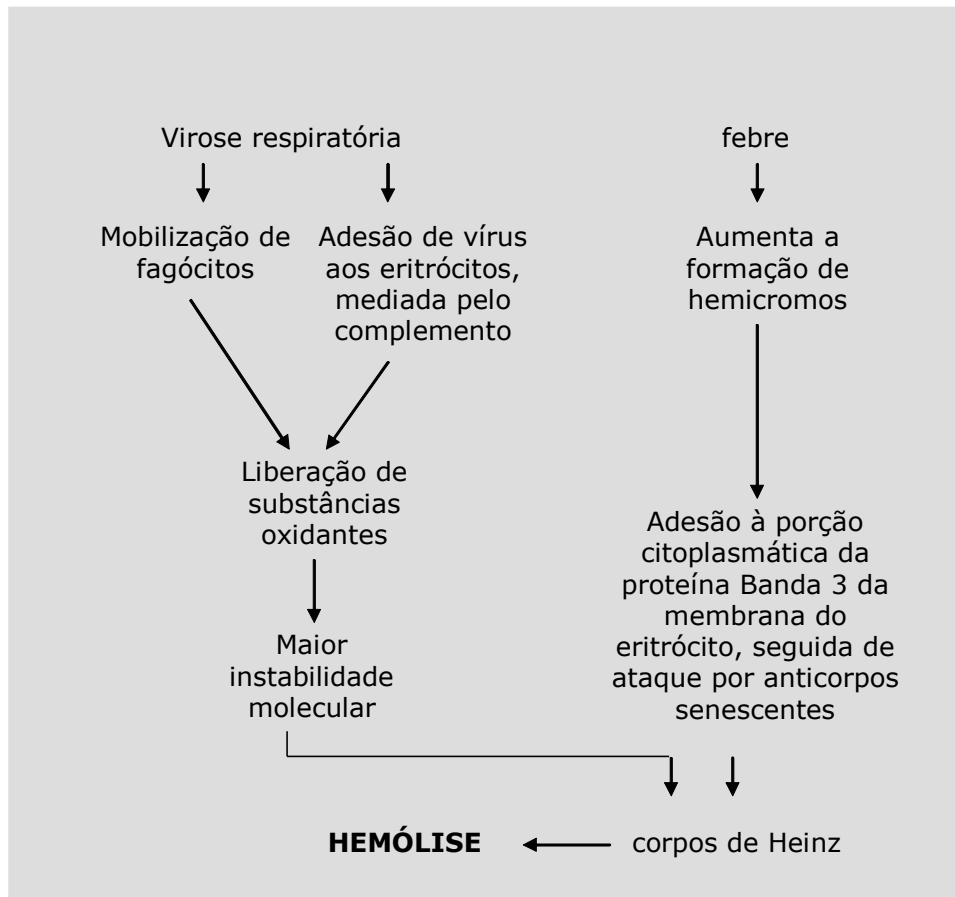
O aumento de glicose-6-fosfato desidrogenase (G-6-PD) tem sido relatado em 12% dos portadores desse tipo de hemoglobinopatia.

O aumento da fragilidade osmótica eritrocitária ocorre em pelo menos 5% desses pacientes.

Aspectos clínicos

Os sinais e sintomas clínicos acompanham o grau de instabilidade da molécula, ou seja, as hemoglobinas levemente instáveis são assintomáticas, e as bastante instáveis produzem o quadro de anemia hemolítica grave. O início da doença depende, porém, do tipo de cadeia globínica afetada: as de cadeia alfa, ou gama, têm início no período neonatal, e as de cadeia beta somente após 3 a 4 meses de vida. Nesta ocasião podem desaparecer os sintomas causados pela anormalidade na cadeia gama, devido à sua substituição pela beta. Outro fator que pode influenciar a clínica é o grau de afinidade da hemoglobina ao oxigênio: a hemoglobina instável pode possuir afinidade com redução do P_{50} , ocasionando poliglobulia, ou baixa afinidade com elevação do P_{50} , e resultando em cianose por formação da metaemoglobina. A poliglobulia associada à hemólise compensada pode elevar os níveis de hemoglobinas do paciente próximo ao limite superior da faixa normal.

Uma importante característica clínica das hemoglobinas instáveis são as “crises hemolíticas”, de início abrupto, desencadeadas por infecção de origem viral ou pela ingestão de drogas oxidantes (derivados das sulfonamidas). A doença pode tornar-se sintomática e ser diagnosticada, nesta ocasião, pela queda rápida e intensa da hemoglobina nas variantes levemente instáveis. Esta situação é causada por elevação do grau de instabilidade molecular. Com relação ao quadro infeccioso, tem sido proposto o seguinte mecanismo fisiopatológico:



Têm sido relatadas também as “crises aplásticas”.

Nas variantes muito instáveis, o quadro de anemia hemolítica crônica acha-se completamente instalado no fim do primeiro ano de vida, além de icterícia, esplenomegalia, palidez e alguns casos com eliminação de urina escura pela excreção de dipirróis derivados dos corpos de Heinz, e de cianose causada pela presença de metaemoglobina (tabela 9.3).

Tabela 9.3: Características clínicas dos portadores de hemoglobinas instáveis.

Anormalidades	Frequência %	Comentários
Icterícia neonatal	5	Não relatado.
Sintomas de anemia	80	Variável. Depende da afinidade ao oxigênio e indução de drogas oxidantes.
Cianose	32	Causada por meta e sulfoemoglobinemia.
Pigmentúria	64	Excreção de dipirróis do grupo heme.
Esplenomegalia	86	Atuação imunológica de macrófagos
Intolerância a drogas	10	contra eritrócitos com corpos de Heinz notadamente as do tipo oxidantes.

Outros achados incluem colelitíase, alterações ósseas e retardo do crescimento, podendo-se assemelhar à talassemia beta homozigota, com eritropoiese ineficaz. Diante de um quadro de anemia hemolítica hereditária não-esferocítica com hipocromia e reticulocitose desproporcional, deve-se suspeitar de hemoglobina instável.

A herança sendo autossômica dominante evidencia-se a doença nos heterozigotos. São descritas interações com a talassemia beta, Hb Lepore, Hb S, Hb C, entre duas Hb instáveis, e adquirida após doença mieloproliferativa (*Policitemia vera*).

O tratamento baseia-se na prevenção de uso de drogas oxidantes e de infecções, e pela administração de ácido fólico em doses baixas (1mg/dia). As transfusões de concentrado globular podem ser necessárias constantemente nas formas graves, levando às complicações e aos riscos inerentes. Quelantes de ferro podem ser tentados para o controle do acúmulo de ferro. A esplenectomia poderá ser útil, mas nem todos os casos dela se beneficiam. Nas variantes com alta afinidade da hemoglobina pelo oxigênio, há registro de mortes por tromboembolia secundária a eritrocitose compensatória, muitas vezes exagerada em situações de pós-esplenectomia que pode estar associada à hemólise e plaquetose. Nestes pacientes ela deve, portanto, ser evitada. Se indicada,

deve-se realiza-la após o sexto ano de vida, promovendo a vacinação antipneumocócica prévia e a profilaxia penicilínica após a idade adulta, devido à alta incidência de septicemia por germes encapsulados. A colecistectomia poderá, também, ser necessária.

O prognóstico das hemoglobinas instáveis geralmente é benigno.

CAPÍTULO 10 - ANÁLISE LABORATORIAL PARA O DIAGNÓSTICO DAS HEMOGLOBINOPATIAS

Introdução

A solicitação por parte do médico de um exame específico para confirmar a suspeita clínica de determinada hemoglobinopatia, por exemplo, doença falciforme, geralmente se faz apenas pelo pedido da análise de eletroforese de hemoglobinas. Situação mais difícil se observa quando o paciente é clinicamente assintomático, porém seus índices hematimétricos exibem discreto grau de anemia microcítica (ex.: VCM: 73 fL) e hipocrômica (ex.: HCM: 21 pg), como ocorre frequentemente nas talassemias alfa e beta menor.

Por outro lado, nem sempre a eletroforese ou a cromatografia (HPLC) de hemoglobinas oferecem resultados satisfatórios, pois há várias situações que impedem conclusões seguras. Por exemplo: um paciente portador de talassemia beta menor, que geralmente tem a Hb A₂ com concentração elevada, pode mostrar níveis normais dessa hemoglobina se tiver associada a anemia ferropriva – a deficiência de ferro interfere na síntese da Hb A₂, tornando-a com valores diminuídos.

Por razões semelhantes aos exemplos mostrados acima é fundamental que sejam fornecidas pelo médico duas informações básicas:

- a – resumo clínico do paciente, inclusive com relato referente a tratamentos usados (ex.: ferroterapia sem sucesso para a correção da anemia);
- b – resultado(s) de hemograma (s) do paciente.

Com essas informações é possível estabelecer um planejamento de análise laboratorial que permitirá ao profissional de laboratório concluir com segurança o laudo de suas análises.

Apresentamos, a seguir, as três fases que compõem o planejamento de análises laboratoriais para o diagnóstico das hemoglobinopatias.

Primeira fase ou fase seletiva

Essa fase é composta por análises laboratoriais que permitem identificar os principais genótipos de hemoglobinas variantes (AS, ASH, SS, SC, SF, AC, ACH, CC, CF) e de talassemias (AA₂↑, AF, AH). Essas análises são as seguintes:

- a – Eritrograma (Hb, VCM e HCM)
- b – Morfologia eritrocitária
- c – Eletroforese de hemoglobina em pH alcalino
- d – Teste de resistência osmótica em NaCl 0,36%

Eritrograma – é um exame importante, pois auxilia na identificação de talassemias beta menor, alfa menor, interação entre talassemias alfa e beta com Hb S ou com Hb C, principalmente. Além disso, é um fator decisivo na diferenciação de genótipo da Hb SF da anemia falciforme com persistência de Hb Fetal elevada em comparação com o outro genótipo da Hb SF observado na interação entre Hb S e talassemia beta. A tabela abaixo exemplifica bem a importância do eritrograma nesses e em outros casos.

Tabela 10.1: Genótipos de Hb S relacionados a valores do eritrograma.

Genótipos	Hb (g/dL)	VCM (fL)	HCM (fL)	Hb S (%)	Hb F (%)
SS*	5 – 9	N	N	94 – 98	2 – 10
SF*	5 – 9	N	N	80 – 90	5 – 20
SF**	7 – 10	D	D	80 – 90	5 – 20
SF***	10 – 14	N	N	60 – 80	15 – 30

* : anemia falciforme: Hb SS com Hb Fetal normal e Hb SF com Hb Fetal elevada.

** : anemia falciforme com Hb Fetal elevada ou SF na S/Beta Talassemia.

*** : anemia falciforme com Hb Fetal elevada devido à persistência hereditária de Hb Fetal.

Morfologia eritrocitária - é uma análise que fornece "pistas" de talassemias, doença falciforme e até de Hb Instáveis. O esfregaço pode ser corado ou sem coloração. O esfregaço corado é melhor obviamente, pois mostra a intensidade de hipocromia, de policromasia, de inclusões eritrocitárias, presença de eritroblastos, entre outros. As figuras 10.1 e 10.2 mostram células características de talassemia beta.

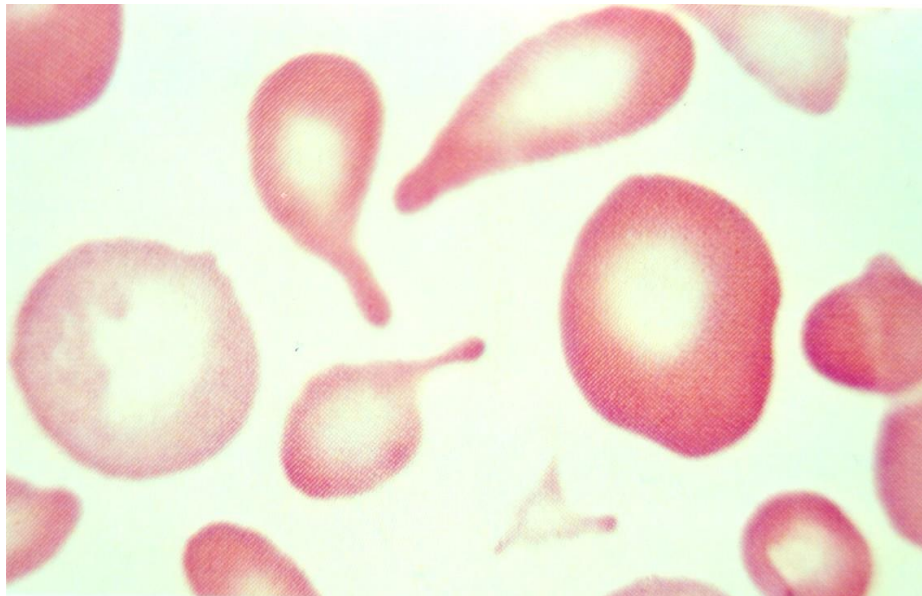


Figura 10.1 - Esquisócitos e dacriócitos na talassemia beta menor. O macrócito da esquerda com discreta policromasia é provavelmente um reticulócito circulante, enquanto que o macrócito da direita se deve à deficiência de folatos - situação comum em portadores de talassemia beta menor e outras anemias hemolíticas crônicas.

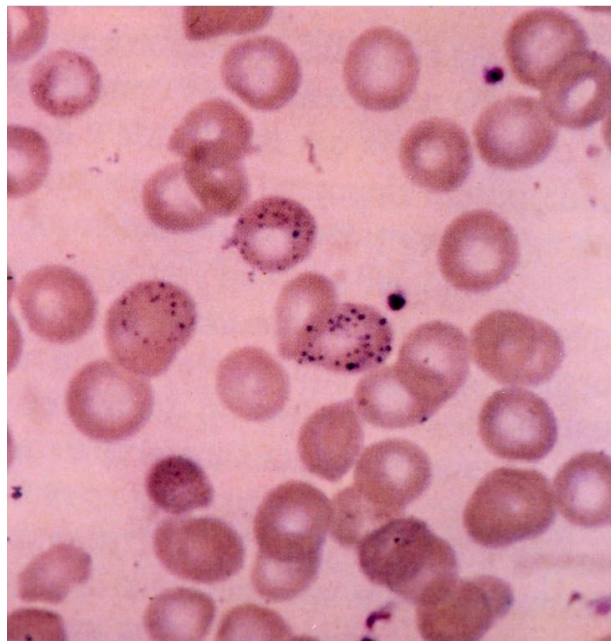


Figura **10.2** - A foto mostra em seu centro três eritrócitos com pontilhados basófilos em paciente com talassemia beta menor.

Eletroforese de hemoglobina em pH alcalino – essa análise permite a separação dos principais genótipos de hemoglobinas variantes e talassemias. A sua avaliação é qualitativa, podendo em algumas situações supor que determinada fração de hemoglobina esteja elevada. A figura 10.3 mostra nove aplicações de amostras de sangue hemolisado com saponina a 1%. É sempre importante aplicar amostra padrão (Hb AA) para fins comparativos. Observe nessa foto a Hb A₂ diminuída em paciente com ferropenia, a dupla heterozigose de Hb AGC com quatro frações, e as variantes AC, SC, SF, SS e AS.

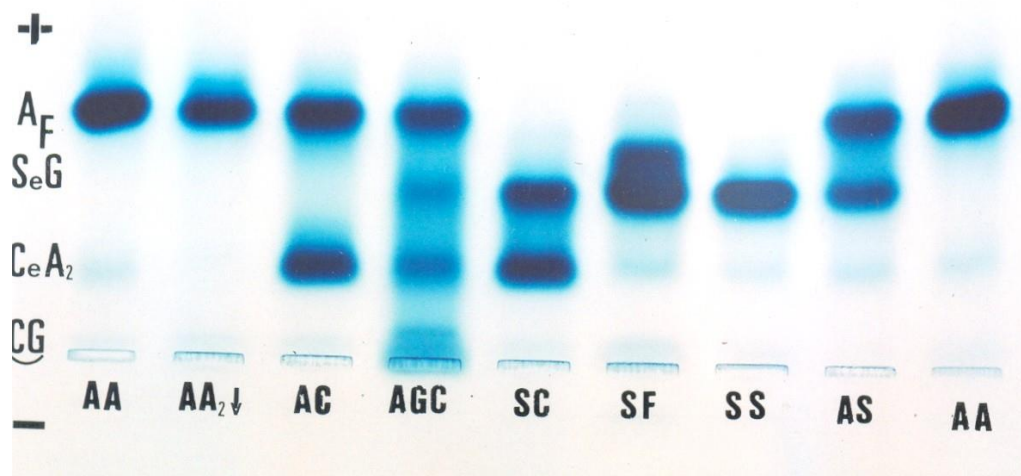


Figura 10.3 – Fracionamento de vários genótipos de hemoglobinas em eletroforese feita em agarose alcalina pH 9,0.

A eletroforese de hemoglobina em pH alcalino quando realizado em acetato de celulose permite a visualização da Hb H que está presente e pessoas portadoras de talassemia alfa. Para identificar a Hb H são necessários alguns procedimentos:

- 1 – usar amostra de sangue hemolisada com saponina a 1%.
- 2 – aplicar excessiva quantidade de hemolisado.
- 3 – avaliar visualmente a presença da fração de Hb H entre 5 a 10 minutos do início da corrida eletroforética.
- 4 – ao comprovar a presença de Hb H, anote a ficha do paciente, pois com o passar do tempo o processo termodinâmico da eletroforese desnatura a Hb H.

A figura 10.4 destaca a presença da Hb H na amostra de nº 3. Observe que a Hb A₂ está diminuída no portador de Hb H – esse fato é comum na talassemia alfa.

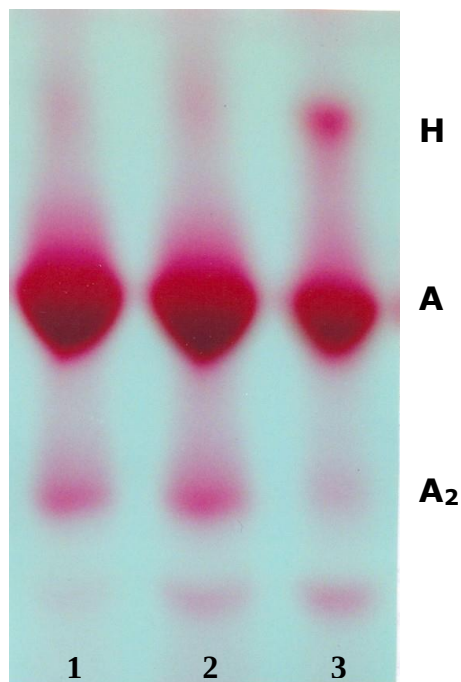


Figura 10.4 – Eletroforese alcalina em acetato de celulose. As amostras 1 e 2 são normais para hemoglobinas (Hb AA) e a de nº 3 pertence a uma pessoa com talassemia alfa (Hb AH).

Observação: Pelo fato de usar o sangue total para ser hemolisado com saponina, ao corar a eletroforese é possível visualizar a proteína globulina alfa-2 na mesma região da Hb H. As amostras 1 e 2 mostram traços de alfa-2-globulina.

Teste de resistência osmótica em NaCl 0,36% - esse teste é seletivo para identificar possíveis portadores de talassemia beta menor. Os eritrócitos esquisócitos desses pacientes não hemolisam nessa solução, tornando-a turva, conforme mostra a figura 10.5. É importante destacar que esse teste não tem valor como diagnóstico laboratorial e sua função é apenas auxiliar. A positividade também ocorre nos genótipos AC, SS, SC e SF, além de casos com anemia ferropriva intensa.

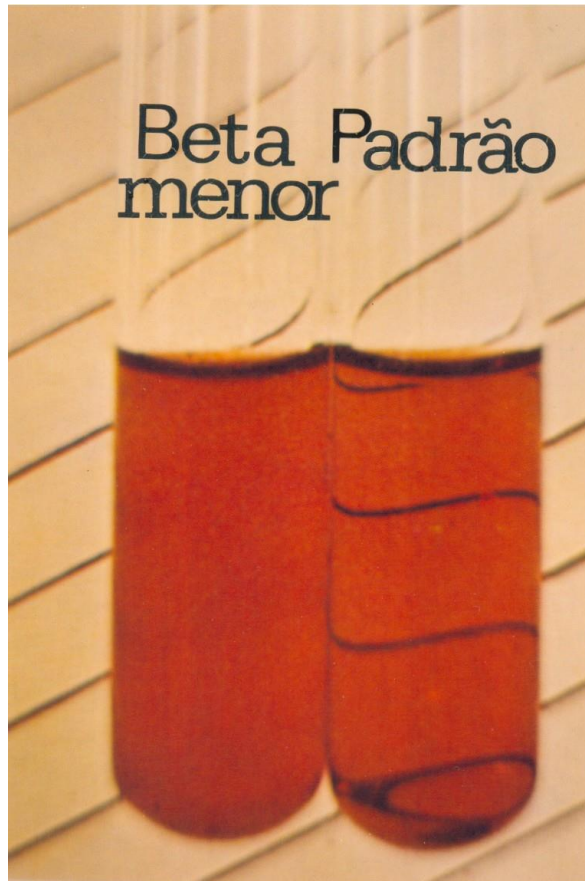


Figura 10.5 – Teste de resistência osmótica em solução de NaCl 0,36%. Pessoas com talassemia beta menor tem seus eritrócitos mais resistentes quando comparados com o padrão (Hb AA).

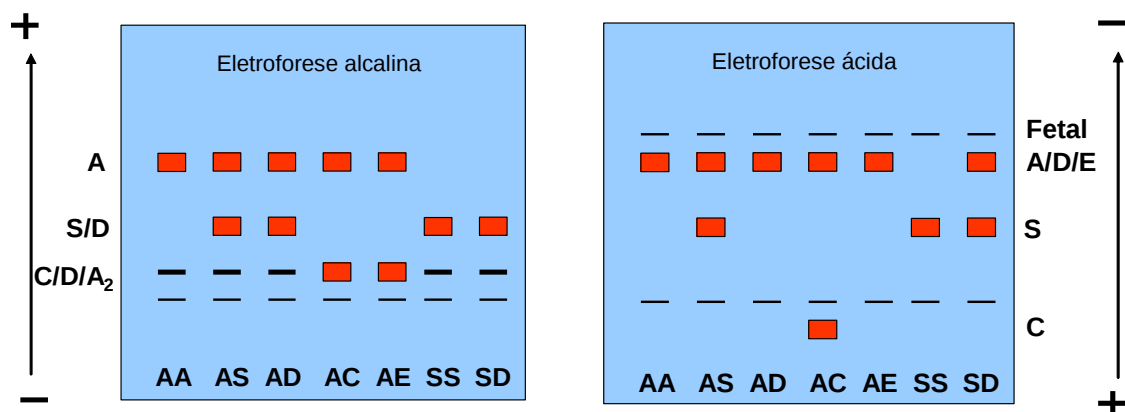
Segunda fase ou fase complementar

Os testes dessa fase complementam os resultados das análises obtidos na primeira fase. Por exemplo, quando se identifica a presença de Hb S em diferentes genótipos (AS, SS, SC, etc.) por eletroforese de hemoglobina em pH alcalino, não há certeza de que essa variante seja realmente a Hb S, uma vez que diversas outras variantes

também migram nessa posição (ver no capítulo 6 – Lista de Hb Variantes). O teste de falcização pode resolver os genótipos de Hb AS e Hb SC, mas não resolve a diferenciação entre Hb SS e Hb SD pois ambos seriam positivos – a Hb D é a variante mais comum que migra na mesma posição da Hb S. Objetivamente a técnica que resolve essa questão é a eletroforese em agarose ácida que está descrita no capítulo 11 – Técnicas Laboratoriais. Outras análises complementares são fundamentais para quantificar hemoglobinas, especialmente as hemoglobinas A₂ e Fetal, a comprovação da presença de Hb H e, finalmente, a contagem de eritrócitos. Por essa razão, a segunda fase é composta pelas seguintes análises laboratoriais:

- a) Eletroforese em agarose ácida;
- b) Eletroforese alcalina quantitativa;
- c) Pesquisa intraeritrocitária de Hb H;
- d) Contagem de reticulócitos.

Eletroforese em agarose ácida – é específica para diferenciar alguns tipos de hemoglobinas variantes mais lentas que a Hb A, quais sejam: diferencia a Hb S da Hb D, e a Hb C da Hb E, pois Hb S e Hb D migram na mesma posição em eletroforese alcalina e o mesmo ocorre em relação às Hb C e Hb E. Por meio do uso da eletroforese em agarose ácida as Hb S e Hb C são mais lentas que a Hb A, enquanto que as Hb D e Hb E migram na mesma posição da Hb A, conforme mostra a representação gráfica e a figura 10.6.



Representação gráfica da separação de sete genótipos em eletroforese em agarose ácida. A Hb Fetal nos sete genótipos está com concentração normal.

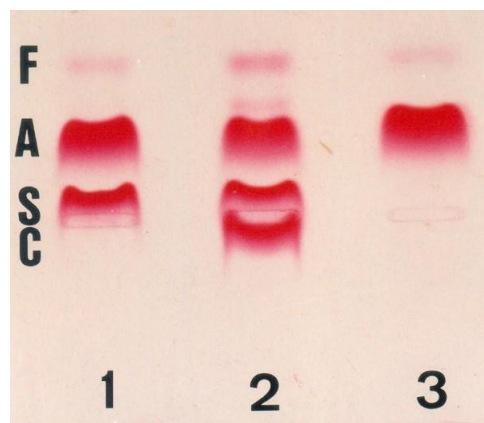


Figura 10.6 – Eletroforese em agarose ácida: (1) Hb AS; (2) Hb FASC e (3) Hb AA.

Esse sistema eletroforético permite também, com excelente qualidade de resolução, a quantificação da Hb Fetal por meio de densitometria, conforme mostra a figura 10.7. Nessa figura é possível observar a Hb Fetal com diferentes concentrações em recém nascidos (1) e (4), em dois genótipos AS (2) e (3), e no (5) em paciente com Hb SS.

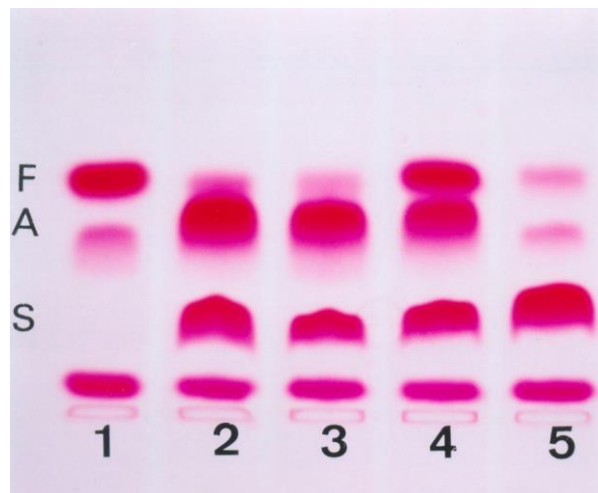


Figura 10.7 – (1) RN com 95% de Hb Fetal e 5% de Hb A; (2) e (3) Hb AS com Hb Fetal normal; (4) RN com Hb ASF e a concentração de Hb Fetal foi de 32%; (5) Hb SS com traços de Hb A proveniente de transfusão e Hb Fetal normal.

Eletroforese alcalina quantitativa – é usada especialmente para dosar a Hb A₂, notadamente quando a suspeita é de talassemia beta menor. 95% dos casos de talassemia beta menor a Hb A₂ está elevada com concentrações variáveis entre 4,1 a 7,5% (Hb A₂ normal: 2 a 4%). A eletroforese alcalina quantitativa também pode ser empregada na dosagem de frações variantes em diversos genótipos (AS, AI, SC, SF, etc.). As quantificações podem ser realizadas por meio de avaliações densitométricas ou elutivas que estão descritas no capítulo 11 – Técnicas Laboratoriais.

Pesquisa intraeritrocitária de Hb H – é um teste citológico feito para comprovar a presença de Hb H identificada inicialmente por eletroforese alcalina. Os corpúsculos precipitados de Hb H no interior dos eritrócitos se devem às globinas beta “livres” que ficaram despareadas das globinas alfa devido à talassemia alfa. Os precipitados de Hb H somente são visíveis com coloração vital por meio do uso de azul de crezil brilhante a 1% ou o

novo azul de metileno. A técnica, também usada para contagem de reticulócitos e pesquisa de corpos de Heinz, pode ser consultada no capítulo 11 – Técnicas Laboratoriais. A figura 10.8 representa a precipitação de Hb H em talassemia alfa menor. Observe que a intensidade de corpúsculos precipitados é variável entre os diferentes eritrócitos e usamos uma foto em que aparece um reticulócito (RET) para mostrar a evidente diferença entre esta célula e os eritrócitos com Hb H.

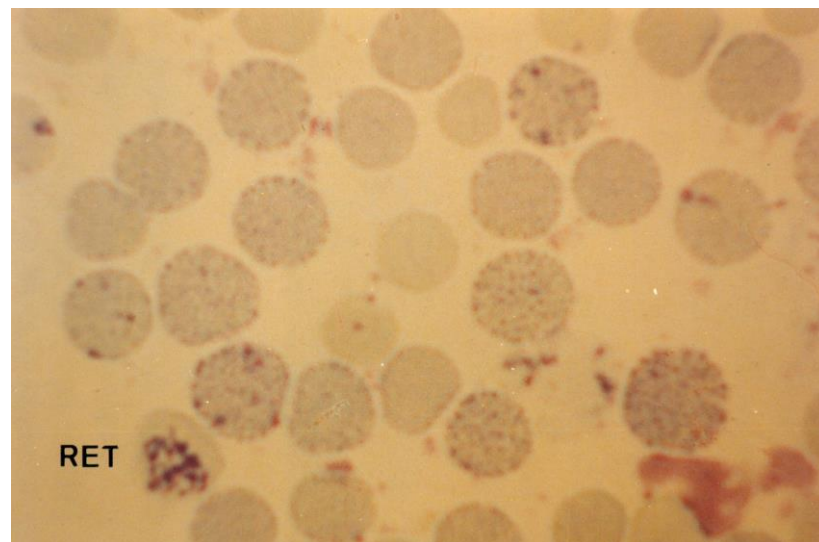


Figura 10.8 – Precipitados de Hb H no interior de eritrócitos de amostra de sangue com talassemia alfa. A esquerda, canto inferior, um reticulócito (RET) para mostrar a sua diferença em relação aos precipitados de Hb H.

Contagem de reticulócitos – é um exame complementar de grande utilidade para compor o diagnóstico de anemias hemolíticas, entre as quais se destacam a doença falciforme, talassemias maior e intermédia, e Hb Instáveis. Fisiologicamente a contagem dessas células avalia indiretamente o grau de eritropoiese em pacientes anêmicos, mas também pode ser usada como referência à resposta terapêutica da anemia e, inclusive, avaliar o grau de destruição eritrocitária que ocorre no processo hemolítico, como por exemplo na malária, anemia hemolítica auto-imune e nas Hb Instáveis.

Terceira fase específica para Hb raras.

As análises que compõem essa fase se destinam ao diagnóstico de hemoglobinas variantes raras ou de componentes provenientes da degradação da hemoglobina como são os casos de metaemoglobina e corpos de Heinz. Assim, as análises específicas são:

- a) Pesquisa de corpos de Heinz;
- b) Testes de precipitação de Hb Instáveis;
- c) Dosagem de metaemoglobina;
- d) Eletroforese de Focalização Isoelétrica;
- e) Biologia Molecular.

Pesquisa de corpos de Heinz – os corpos de Heinz são produtos de globinas instáveis que se precipitam no interior dos eritrócitos e que podem ter várias causas: Hb Instáveis, toxicidade da hemoglobina causada por produtos oxidantes (NOx, SOx, sulfas, hidrazinas, etc.) e por deficiência enzimática dos eritrócitos, como a que ocorre na deficiência da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase. Esses precipitados somente são visualizados após incubação com corantes vitais (azul de crezil brilhante e novo azul de metileno). A técnica é mesma usada para pesquisa intraeritrocitária de Hb H e na contagem de reticulócitos, conforme descrita no capítulo 11 – Técnicas Laboratoriais. Os corpos de Heinz precipitam no interior dos eritrócitos e tem uma taxa em direção à membrana da célula, conforme pode ser observado na figura 10.9. Essa adesão dos corpos de Heinz às proteínas de membrana causa alterações na camada lipo-protéica e em especial da proteína Banda-3, expondo-a externamente. Essa exposição torna o eritrócito afetado susceptível imunologicamente à ação de macrófagos e, conseqüentemente, ocorre fagocitose parcial ou total dos eritrócitos, induzindo a anemia hemolítica.

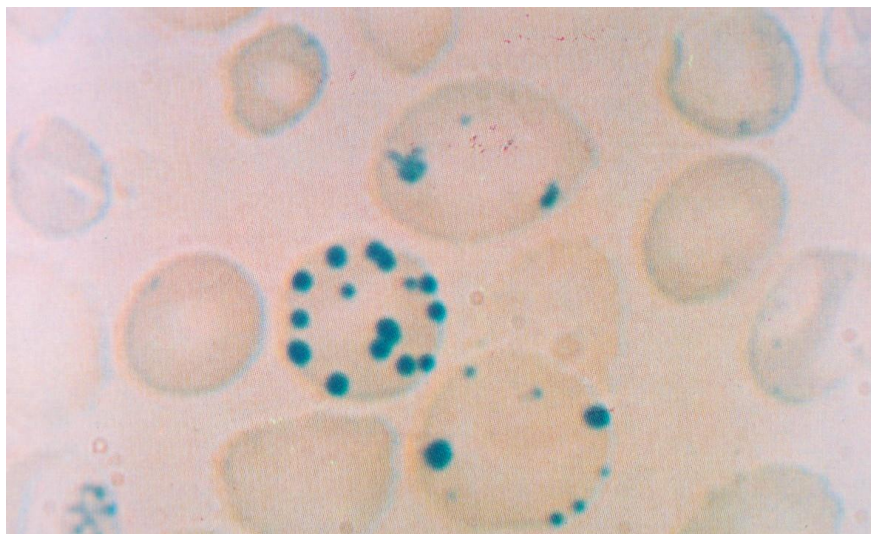


Figura 10.9 – Corpos de Heinz precipitados no interior dos eritrócitos em um caso de Hb Instável.

Testes de precipitação de Hb Instáveis – as hemoglobinas instáveis são decorrentes de mutações de aminoácidos que ocupam regiões que dão estabilidade à molécula de hemoglobina. A troca de um aminoácido por outro com diferentes características (ex: tamanhos e/ou hidrofobicidade) provoca lesões na estrutura molecular da hemoglobina, deixando-a extremamente sensível ao aumento de temperatura “in vivo” (ex: febre) ou “in vitro” (teste laboratorial). Assim, as hemoglobinas instáveis (ex: Hb Köln figura 10.10) se precipitam quando aquecidas a 55°C ou submetidas ao teste do isopropanol a 37°C (ver capítulo 11 – Técnicas Laboratoriais). Os precipitados são visíveis a partir de 20 minutos de incubação a 55°C ou em 37°C com isopropanol, conforme mostra a figura 10.11.



Figura 10.10 – Eletroforese alcalina em gel de agarose. As duas primeiras amostras são de Hb Koln, um dos tipos de Hb Instáveis; a terceira amostra é de Hb AC e a quarta de Hb AS. A primeira amostra de Hb Koln foi preparada com eritrócitos lavados e, por isso, não é possível visualizar as globinas alfa livres. A segunda amostra de Hb Koln foi aplicada usando sangue total e hemolisado com saponina a 1% e, por essa razão, é possível ver globinas alfa livre.

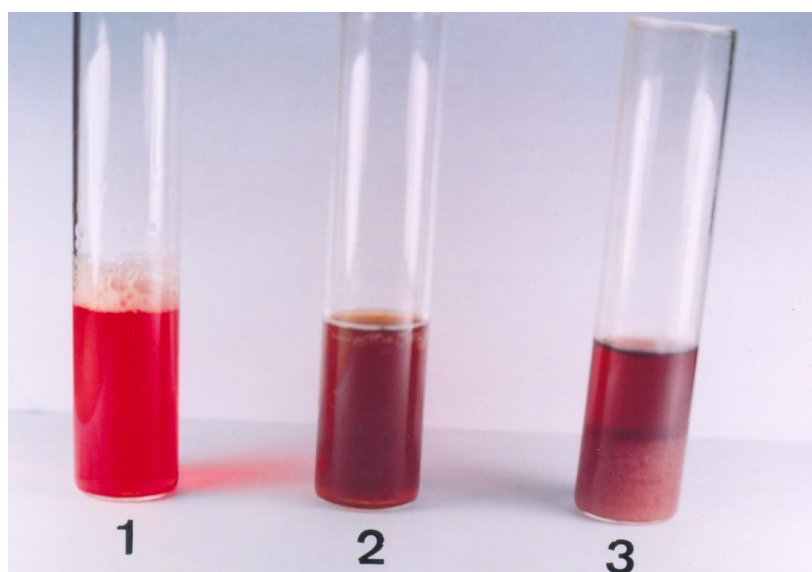


Figura 10.11 – Os três tubos com solução de isopropanol e tris pH 7.4 pertencem ao caso apresentado na figura anterior de Hb Koln – uma hemoglobina instável com mutação na globina beta. O tubo 1 é a mistura do hemolisado com a solução, antes de ser colocado a 37°C; o tubo 2 representa o início da desnaturação com 10 minutos de incubação; o tubo 3 mostra a precipitação da Hb Instável Koln após 20 minutos de incubação. O controle normal (Hb AA) permanece igual ao tubo 1 por 30 minutos de incubação.

Dosagem de metaemoglobina – a elevação de metaemoglobina no sangue de uma pessoa, acima de 5% de concentração, causa cianose visível na cor da pele e nas mucosas. As principais causas da elevação de metaemoglobina são: (1) Hb Instáveis; (2) deficiência de enzimas metaemoglobina redutase; (3) intoxicação por produtos oxidativos, geralmente drogas medicamentosas. Informações completas podem ser encontradas no capítulo 12 – Metaemoglobinas e a dosagem laboratorial estão descritas no capítulo 11 – Técnicas Laboratoriais. Um destaque especial deve ser dado à relação entre elevação de metaemoglobina e

presença de Hb S. A metaemoglobina está discretamente elevada em 50% dos portadores de Hb AS, e muito elevada em 35% dos doentes homozigotos (Hb SS). Trata-se portanto de um teste auxiliar no acompanhamento dos doentes falcêmicos.

Eletroforese de focalização isoeletrica (IEF) – é uma análise de muita sensibilidade técnica que permite a separação de frações muito próximas com excelente nitidez de fracionamento. Supera todas as técnicas de fracionamentos eletroforéticos e cromatográficos. Tem sido usada como teste auxiliar na pesquisa de Hb variantes raras (figura 10.12). Atualmente tem seu uso difundido na análise de hemoglobinas em sangue de recém-nascidos (teste do pezinho). Por ser tecnicamente refinada e economicamente muito cara, seu uso é restrito.

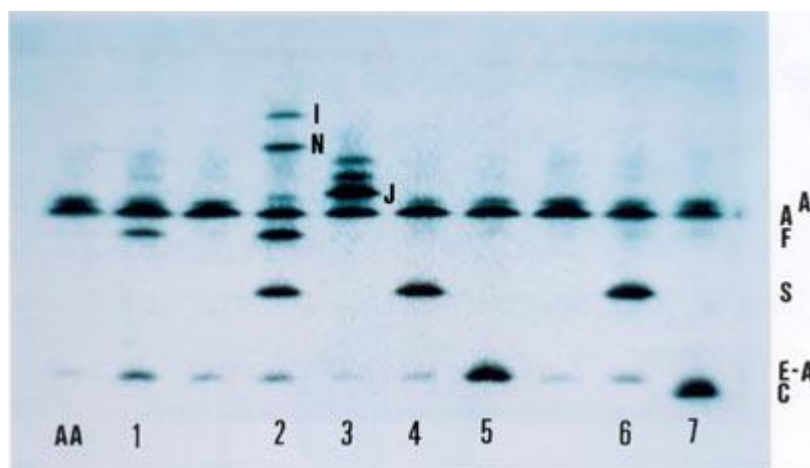


Figura 10.12 – IEF de hemoglobinas variantes raras.

BIOLOGIA MOLECULAR

Com o advento da tecnologia do DNA recombinante, o conhecimento das alterações genéticas obteve um excepcional desenvolvimento. Esse fato permitiu, também, que se conhecessem os diferentes pontos de mutações das hemoglobinopatias variantes, em especial da Hb S e das talassemias.

A organização, estrutura e função dos genes que sintetizam as globinas, assim como sua localização nos respectivos cromossomos estão bem conhecidas, e esse fato têm facilitado o estudo em nível molecular das alterações das hemoglobinas.

A primeira etapa do estudo molecular é a obtenção do DNA na sua forma mais pura possível, cuja técnica segue alguns protocolos entre os quais o exposto na tabela 2. Para o estudo do DNA usam-se as enzimas (endonucleases de restrição) produzidas por determinadas bactérias e que têm a capacidade de "cortar" o DNA em pedaços com sequências de bases nitrogenadas específicas. Para fins práticos, a presença ou ausência de um ponto de reconhecimento (sítio) de uma endonuclease de restrição é devida à sua susceptibilidade a uma determinada enzima de interesse para o estudo molecular. Duas técnicas podem ser utilizadas com esta finalidade, o PCR ("*polimerase chain reaction*") e o "*Southern blotting*".

O PCR é mais viável tecnicamente no momento, e consiste na repetição cíclica da síntese de DNA, mediada por ação enzimática por meio de iniciadores ("*primers*") com cerca de 20 nucleotídeos de orientação oposta, com sequências complementares às duas extremidades do fragmento que se pretende copiar. Destaca-se que os "*primers*" são específicos para cada segmento de DNA que se pretende estudar. O processo de amplificação pela técnica do PCR se realiza em três etapas distintas:

1. separação das fitas de DNA que se quer amplificar, a uma temperatura de 94°C;
2. ligação complementar entre os iniciadores e o DNA, a uma temperatura entre 40 e 60°C, com formação de pequenos fragmentos de fita ;
3. a síntese do DNA pela *taq*-polimerase (enzima obtida de bactéria resistente a altas temperaturas), a 72°C que irá inserir os nucleotídeos complementares, originando duas fitas duplas do DNA idênticas à original.

Tabela 10.2: Método para extração rápida de DNA com uso de CTAB e DTAB

Introdução
Este procedimento permite a obtenção rápida de amostras de DNA genômico a partir de pequena quantidade de sangue.
Soluções
DTAB 12% (dodecyl-trimetil-amonium-bromide) Clorofórmio CTAB 8% (cetyl-trimetil-amonium-bromide) NaCl 1,2 M Etanol absoluto Etanol a 70% H ₂ O deionizada
Etapas
1. preparar " <i>buffy coat</i> " de um volume de 5ml de sangue colhido com anticoagulante, centrifugando 10min a 1.500rpm; 2. recolher o " <i>buffy coat</i> " e dividi-lo em dois tubos tipo " <i>Eppendorf</i> " de 2ml; 500µl para cada tubo; 3. adicionar 500µl de DTAB (<i>dodecyl trimethylammonium bromide</i> – Sigma D08638) a 12% e homogeneizar por inversão por 15s; 4. incubar em banho-maria a 68°C por 5min; 5. adicionar 900µl de clorofórmio e homogeneizar imediatamente por inversão vigorosa por 15s; 6. centrifugar a 10.000rpm em centrífuga refrigerada por 2 minutos; formar-se-ão três camadas; 7. transferir o sobrenadante para outro tubo tipo " <i>Eppendorf</i> " contendo 100µl de CTAB (<i>cetyl trimethylammonium bromide</i> – Sigma H-5882) a 5% e 900µl de água; 8. homogeneizar por inversão até a formação do precipitado; 9. centrifugar a 10.000rpm em centrífuga refrigerada por 2min e desprezar o sobrenadante; 10. dissolver o precipitado em 300µl de NaCl 1,2M; 11. adicionar 750µl de etanol a 99,5% à temperatura ambiente; 12. homogeneizar para precipitação o DNA e centrifugar a 10,000rpm em centrífuga refrigerada por 2min; 13. Desprezar o sobrenadante; 14. Lavar uma vez com etanol a 70% e centrifugar a 10.000rpm por 2min; 15. Descartar o etanol e secar as paredes do tubo 16. Dissolver o DNA em 300µl de água, usando vórtex por 20s; 17. Determinar a concentração do DNA em espectrofotômetro (260 / 280nm).

A orientação oposta dos iniciadores faz com que a síntese de DNA ocorra na região interna entre eles. Assim, o produto da extensão de um iniciador é utilizado como substrato para outro iniciador no ciclo seguinte, resultando na duplicação de quantidade de moléculas de DNA sintetizadas no ciclo precedente, sendo que cada ciclo apresenta duração de aproximadamente 10 minutos. Após algumas horas, cerca de 30 ciclos são realizados com a possibilidade de se conseguir perto de um bilhão de cópias disponíveis do fragmento de DNA inicialmente trabalhado. As etapas da amplificação por PCR devem seguir as especificações do fabricante do equipamento termocíclico, pois serão necessários para cada estudo determinados componentes como *taq*-polimerase, oligonucleotídeos e "*primers*" específicos. Após a amplificação do pequeno segmento de DNA que contém o sítio de interesse, submete-o à digestão com a(s) enzima(s) apropriada(s). Se houver digestão, serão gerados dois fragmentos menores do que o inicial, indicando que o sítio é suscetível à ação da enzima (representada por sinal +). Se não houver digestão, o tamanho do fragmento não se altera (representado por sinal -). Quando há numerosos sítios polimórficos, ao longo de um complexo gênico, cada uma das diferentes combinações desses sítios no mesmo cromossomo é denominada de haplótipo. O número potencial de haplótipo é muito grande. No entanto, muitos não foram até hoje observados e, dessa forma, um pequeno número predomina nas populações humanas.

A técnica de "*Southern blotting*", por sua vez, consiste em digerir o DNA com uma enzima de restrição e submeter o DNA fragmentado a uma eletroforese em gel de agarose, que as separa em função de seus pesos moleculares. Após o fracionamento, o DNA é desnaturado para se obter uma simples hélice, e os fragmentos desnaturados são transferidos para um filtro de nitrocelulose, cujo procedimento é denominado por "*blotting*". Após a transferência, o DNA é hibridizado com sondas específicas (pedaços de DNA complementares ao gene que se deseja estudar e marcados radioativamente) formando um complexo radioativo. O excesso de sondas é lavado, e o filtro de

nitrocelulose é colocado em contato com um filme que irá revelar os locais ou os segmentos de DNA que foram complementares às sondas, e finalmente analisados por meio de auto-radiografia. O padrão de restrição obtido ao final do processo indicará a presença de bandas anormais e ausência de bandas normais, evidenciando os eventuais defeitos moleculares presentes no DNA.

CAPÍTULO 11: TÉCNICAS LABORATORIAIS

Co-autores: Paulo Francisco Naoum

Cristiane Gutierrez Toledo Goulart

Júnia Iannella Alves

Ana Lúcia Gil Guimarães

Introdução

As técnicas laboratoriais descritas neste capítulo são destinadas às metodologias não automatizadas de eletroforeses, avaliações bioquímicas e citológicas dos componentes eritrocitários. Por exemplo, não há como automatizar as pesquisas da desnaturação das hemoglobinas e da presença de corpos de Heinz ou de Hb H nos eritrócitos. Por outro lado, as eletroforeses em pH alcalino podem ser substituídas por métodos automatizados, por exemplo, a eletroforese capilar. Por essas razões, optamos por descrever métodos e técnicas necessárias para complementar resultados eletroforéticos, fato que facilitará a aplicação técnica dos conhecimentos apresentados neste livro.

Preparação de soluções de hemoglobinas (hemolisados)

Os hemolisados para eletroforese de hemoglobinas podem ser feitos por meio do uso de saponina a 1% (100µl de sangue total e 100µl de saponina) ou pelo tratamento com clorofórmio. O uso de clorofórmio destrói a Hb H e Hb Instáveis, porém é usado para a dosagem de Hb Fetal.

Preparação do hemolisado com clorofórmio – a obtenção de hemolisado entre 10 e 15g/dL de hemoglobina, tal qual o método descrito a seguir, é importante para dosagem de Hb Fetal. Para eletroforese qualitativa de hemoglobinas é aconselhável usar hemolisados com

concentrações de hemoglobina variáveis entre 4 a 6g/dL. A técnica de preparação de hemolisados consiste das seguintes fases:

1. Centrifugar 1ml de sangue com anticoagulante a 1.500rpm, durante 5 minutos; remover o plasma e lavar os eritrócitos por duas a três vezes com solução salina a 0,85%. Centrifugar outra vez nas mesmas condições e desprezar o sobrenadante.
2. Ao volume de eritrócitos lavados, adicionar outro de água destilada. Homogeneizar, e a seguir adicionar um volume de clorofórmio, idêntico ao do hemolisado formado. Agitar vigorosamente e centrifugar a 2.000rpm, por 15 minutos.

A solução de hemoglobina sobrenadante, ou hemolisado, é retirada por meio de pipeta Pasteur e transferida para um frasco limpo. A concentração do hemolisado, preparado conforme metodologia apresentada, geralmente é variável entre 10 e 15g/dL.

Preparação de hemolisados rápidos – esse procedimento técnico é recomendável para estudo populacional, nas suspeitas de hemoglobinas instáveis e talassemia alfa. Não é aconselhável utilizá-lo para dosagens bioquímicas de hemoglobinas, especialmente de Hb Fetal.

Reativo hemolisante:

Saponina P.A. 1g
Água destilada 100ml

Procedimento

- a) para amostras de sangue com hematócrito acima de 40%, misturar 1 volume de sangue com 2 volumes de reativo hemolisante;
- b) para amostras de sangue com hematócrito entre 30 e 40%, misturar 1 volume de sangue com 1 volume de reativo hemolisante;
- c) para amostras de sangue com hematócrito abaixo de 30%, misturar 2 volumes de sangue com 1 volume de reativo hemolisante.

A homogeneização deve se processar até a hemólise completa da mistura. Utilizar o hemolisado após 5 minutos, e no máximo 24 horas depois da sua preparação.

Eletroforese qualitativa em acetato de celulose pH 8,0 – 9,0

Princípio

Em pH 8,0 – 9,0 a hemoglobina é uma proteína carregada negativamente, migrando em direção ao pólo positivo. Esse método identifica as hemoglobinas normais e grande parte das variantes. As diferentes mobilidades verificadas entre as diversas hemoglobinas com defeitos estruturais se devem às alterações de cargas elétricas, causadas por substituições de aminoácidos de diferentes pontos isoelétricos (pI). As hemoglobinas que não envolvem alterações de cargas elétricas, geralmente apresentam mobilidade eletroforética semelhante à da Hb A; nesse grupo situa-se a maioria das hemoglobinas instáveis.

Equipamento

1. Cuba de eletroforese
2. Tiras de acetato de celulose
3. Papel absorvente
4. Aplicador de amostras

Reagentes

1. Solução Tampão: Tris-EDTA-borato 0,025M pH 8,5 (TEB pH 8,5)
Tris-hidroximetil-aminometano.....10,2g
Ácido etileno-diamino-tetracético..... 0,6g
Ácido bórico..... 3,2g
Água destilada q.s.p.....1000ml

Procedimento

1. Colocar igual quantidade de solução tampão em cada compartimento eletrolítico da cuba de eletroforese;
2. Embeber o acetato de celulose na solução tampão, previamente colocada numa vasilha, pelo menos durante 15 minutos;
3. Enxugar o acetato de celulose entre duas folhas de papel absorvente para remover o excesso de solução tampão;
4. Ajustar as tiras de acetato de celulose na cuba de eletroforese, deixando-as esticadas, utilizando-se de perfex ou papel de filtro para fazer a ponte de corrente elétrica na fita;
5. Aplicar as amostras nas tiras de acetato de celulose (hemolisado com saponina 1%, ou solução de hemoglobina) a 2 cm do compartimento do pólo negativo;
6. Passar 300 volts por 20 minutos;
7. Analisar o fracionamento, durante os 5 primeiros minutos, observando a presença ou não de Hb H. A Hb H, quando presente, somente é possível de ser visualizada em hemolisados feitos com saponina a 1%.

Controle

Durante a eletroforese é importante o uso de, pelo menos, uma amostra controle. Na ausência de padrões tipo Hb AS, Hb AC, ou outra forma de hemoglobina variante, usa-se uma amostra com hemoglobina normal. O padrão normal constitui-se num excelente meio de comparação entre hemoglobinas “normais” e “anormais”. A utilização de “mapas” de referência é muito útil na interpretação dos resultados.

Precauções

Para o uso de qualquer eletroforese são fundamentais os seguintes cuidados:

1. Verificar se as luvas de mãos, a cuba de eletroforese, as tiras de acetato, o aplicador e o papel absorvente estão limpos;
2. Observar se a solução tampão não está contaminada por colônias de fungos;
3. A solução tampão, usada continuamente, é suficiente para oito a dez procedimentos seguidos. Porém, no uso esporádico, por exemplo, uma vez por semana, é interessante conservar a cuba com tampão na geladeira;
4. A obtenção de fracionamento deficiente pode ser causada por:
 - a) solução tampão deteriorada;
 - b) alteração do pH do tampão;
 - c) alta molaridade do tampão;
 - d) corrente elétrica deficiente;
 - e) má qualidade do acetato de celulose;
 - f) excesso ou deficiência da amostra aplicada.

Dosagem de Hb A₂ por eletroforese de acetato de celulose pH 8,0 - 9,0

Utilizam-se os mesmos equipamentos, reagentes, e procedimentos da técnica anterior.

Procedimento específico

- a) Aplicar 20 μ l da solução de hemoglobina, numa única tira de acetato de celulose, com 4,5 a 5,5 cm de largura. Para acetato de celulose com 2,5 cm de largura usar duas tiras, depositando 10 μ l em cada uma delas;
- b) Passar 300 volts durante 20 minutos;
- c) Após o fracionamento, as hemoglobinas A e A₂, são recortadas com tesoura e eluídas em tubos contendo água destilada, na quantidade de

3 ml (para a Hb A₂) e 9 ml (para a Hb A). Deixar a eluição se processar por 2 horas à temperatura ambiente, homogeneizando por inversão os tubos a cada 15 minutos. Nas eluições superiores a 2 horas, conservar o material sob refrigeração.

d) Usar água destilada como branco, e fazer a leitura em espectrofotômetro, a 410 nm;

e) Cálculo:

$$\% \text{ Hb A}_2 = \frac{\text{DO A}_2 \times 100}{\text{DO A} \times 3 + \text{DO A}_2}$$

VR: 2,0 à 4,0%

Eletroforese em ágar pH 6,2

Princípio

O emprego da eletroforese em ágar pH 6,2 é específico para diferenciar alguns tipos de hemoglobinas mais lentas do que a Hb A, quais sejam: Hb S da Hb D e Hb C da Hb E, que migram em posições similares em eletroforeses alcalinas. Por essa técnica as hemoglobinas S e C separam-se da Hb A, enquanto as hemoglobinas D e E migram na mesma posição da hemoglobina A. Esse sistema de fracionamento propicia, também, a quantificação de Hb Fetal.

Equipamento

1. cuba de eletroforese e fonte geradora de voltagem
2. papel de filtro
3. aplicador de amostra (lamínula ou lâmina de barbear)
4. erlenmayer de 200 a 250 ml
5. lâmina de microscópio

6. pipetas de 10 ml

Reagentes

1. Solução Tampão Fosfato pH 6,2

Na_2HPO_4 2,02g

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,6g

Água destilada q.s.p.....1000ml

Esta solução será usada nos compartimentos eletrolíticos bem com na preparação do gel de agar.

2. bacto-ágar (Difco Lab.)

Procedimento

1. Colocar no erlenmayer 200mg de agar e dissolve-los em 20ml do tampão fosfato, levando-o ao fogo e agitando-o rotatoriamente a cada 10 minutos, até a completa dissolução do agar;
2. Pipetar 3,5ml do gel liquefeito em cada lâmina. Esse procedimento dever ser realizado cuidadosamente: coloca-se a pipeta verticalmente na porção média da lâmina, e deixa-se que o gel se escoe lentamente por toda a extensão da lâmina, até completar o volume 3,5ml, deixar por 10 a 15 minutos em repouso;
3. Aplicar as amostras (solução de hemoglobina, ou hemolisado com saponina) na porção média da lâmina. Para isso usa-se pedaço de lamínula, ou de lâmina de barbear (tipo Gillette), molhado em sua extremidade com a amostra a ser analisada. A aplicação se faz introduzindo verticalmente o aplicador no gel, observando-se o cuidado de não atingir a lâmina;
4. Colocar a lâmina na cuba de eletroforese, e conectar suas extremidades com os respectivos compartimentos eletrolíticos por meio de "pontes" realizadas com duplo papel de filtro;
5. Passar 100 a 150 volts por 20 a 15 minutos, respectivamente;
6. Analisar o fracionamento, inicialmente sem corar;

7. Remover a lâmina e corar com Ponceau S (ou outro corante de proteínas) por 20 minutos;
8. Descorar com ácido acético a 5%.

Observação: É possível comprar géis prontos para este procedimento sob o nome de agarose ácida para eletroforese de hemoglobinas.

Dosagem bioquímica de Hb Fetal

Princípio

A Hb Fetal é mais resistente à desnaturação por soluções fortemente alcalinas do que outros tipos de hemoglobinas. O teste é realizado adicionando-se uma determinada quantidade de solução alcalina em uma concentração conhecida de hemolisado preparado de eritrócitos lavados e tratados com água e clorofórmio. Após um tempo específico, a desnaturação é bloqueada por adição de sulfato de amônio saturado, ou parcialmente saturado. O sulfato de amônio diminui o pH e precipita a hemoglobina saturada. Após a filtração, a quantidade de hemoglobina inalterada é avaliada e expressa como hemoglobina álcali-resistente (ou Hb Fetal) em valores percentuais.

Equipamento

1. espectrofotômetro
2. pipetas de 1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml
3. cronômetro
4. papel de filtro
5. tubos 17 X 100 mm
6. funis pequenos

Reagentes

1. Solução de Drabkin (cianeto)

$K_3Fe(CN)_6$200mg

KCN.....200mg

Água destilada q.s.p.....1000ml

2. NaOH 1,2N

NaOH.....48g

Água destilada q.s.p.....1000ml

3. Solução saturada de sulfato de amônio

$(NH_4)_2SO_4$500g

Água destilada q.s.p.....500ml

Procedimento

1. Diluir 0,6 ml da solução de hemoglobina em um tubo contendo 10 ml da solução de Drabkin. Homogeneizar bem por inversão.
2. Colocar 5,6 ml da solução de hemoglobina diluída no item 1 em um tubo rotulado "Hb Fetal". Adicionar 0,4 ml da solução NaOH 1,2 N e acionar o cronômetro. Agitar cuidadosamente por 10 segundos.
3. Ao final de dois minutos exatos, adicionar 4 ml da solução saturada de sulfato de amônio. Homogeneizar por inversão e deixar em repouso por 5 a 10 minutos no máximo.
4. Filtrar o conteúdo do tubo "Hb Fetal" em papel de filtro duplo.
5. Preparar a solução padrão, colocando em um tubo de ensaio: 1,4 ml da solução de hemoglobina diluída no item 1, 0,1 ml de água destilada e 1 ml da solução saturada de sulfato de amônio. Homogeneizar e transferir 1 ml dessa solução para outro tubo, e juntar 9 ml de solução Drabkin. A solução padrão é 10 vezes mais diluída do que a solução de "Hb Fetal".

6. Ler a DO do tubo "Hb Fetal" e do padrão em 540 nm, utilizando-se como branco a solução de Drabkin.

7. Cálculo:

$$\% \text{ Hb Fetal} = \frac{\text{DO Hb Fetal} \times 100}{\text{DO padrão} \times 10}$$

VR: 0,0 à 2,0% para adultos normais

Teste de precipitação para hemoglobinas instáveis

Princípio

As cadeias da hemoglobina (e o tetrâmero) são estruturas altamente estáveis, e dependem da força coletiva de quatro fatores:

1. um grande conteúdo helicóide que constitui 75% da estrutura de cada cadeia polipeptídica;
2. o firme ligamento entre o grupo heme e o polipeptídeo (globina);
3. a localização interna de aminoácidos não-polares e hidrofóbicos, que mantêm o "pacote" de proteção ao grupo heme;
4. os contatos $\alpha_1\beta_1$ que estabilizam a integração entre as cadeias alfa e beta.

A diminuição da estabilidade da hemoglobina pode ser resultante da alteração de qualquer um dos quatro fatores, geralmente sensíveis quando expostos ao calor.

Em um tampão apropriado, a hemoglobina normal é dificilmente precipitada quando submetida à determinada temperatura (50 a 60°C); por certo tempo de exposição sob as mesmas condições, as hemoglobinas instáveis se desnaturam e se precipitam.

Apresentaremos dois testes específicos para detectar hemoglobinas instáveis: a) desnaturação ao calor e b) precipitação por isopropanol.

Teste de desnaturação ao calor

Equipamento

1. tubos de vidro 17 x 100mm e 12 x 75mm
2. pipetas de 5ml
3. centrífuga
4. banho-maria: 50 a 60°C
5. pH metro
6. balão volumétrico de 100ml

Reagentes

1. Solução fosfato monobásico de sódio 0,1M
NaH₂PO₄ . H₂O.....13,8g
Água destilada q.s.p.....1 litro
2. Solução de hidrogenofosfato de di-sódio 0,1M
Na₂HPO₄ (anidro).....14,2g
Água destilada q.s.p.....1 litro
3. Solução tampão fosfato, pH 7,4:
Solução de NaH₂PO₄ 0,1M.....19,2ml
Solução de Na₂HPO₄ 0,1M..... 80,8ml
4. NaCl a 0,8%

Procedimento

1. Em um tubo de hemólise colocar 1ml de sangue fresco, coletado com anticoagulante. Centrifugar a 1.500rpm e desprezar o plasma. Lavar os eritrócitos com NaCl a 0,85%, por duas vezes. Hemolisar os eritrócitos com 5ml de água destilada. Homogeneizar por seis vezes;
2. Transferir o hemolisado para um tubo maior e, adicionar 5ml do tampão fosfato (pH 7,4), homogeneizar por seis vezes e centrifugar por 10 minutos a 1.500rpm;
3. Transferir 2ml do sobrenadante para outro tubo e incubá-lo a 50°C, em banho-maria, por uma hora, ou a 60°C por trinta minutos;
4. Observar se houve precipitação.

Controle

É fundamental o uso de uma amostra controle, obtida nas mesmas condições da amostra teste.

Interpretação

Em sangue com hemoglobinas normais é possível que ocorra discreto grau de precipitação. O resultado é positivo quando a precipitação é floculenta e em grande quantidade.

Precauções

1. as amostras a serem analisadas não devem exceder 72 horas após a coleta;

2. o diagnóstico da Hb instável deve ser confirmado por outros testes específicos: corpos de Heinz, eletroforese de hemoglobina, dosagem de metaemoglobina;
3. a temperatura e o pH 7,4 do tampão são pontos críticos nesse teste.

Teste de precipitação por isopropanol

Equipamento

1. tubos de vidro 17 x 75mm e rolha
2. pipeta de 5ml
3. micropipeta de 100 μ l
4. banho-maria: 37°C
5. centrífuga
6. pH metro

Reagentes

1. Solução tampão Tris/isopropanol pH 7,4
Tris-hidroximetil-aminometano....12,11g
Isopropanol puro 170ml
Água destilada q.s.p.....1 litro
Ajustar o pH 7,4 com HCl concentrado

Procedimento

1. Colocar 100 μ l de sangue + 100 μ l de saponina a 1% em um tubo de hemólise. Agitar moderadamente até que se processe a hemólise;
2. Adicionar ao hemolisado, 2ml de tampão Tris/isopropanol previamente equilibrado a 37°C. Agitar moderadamente, ou homogeneizar por inversão, e incubar essa solução por uma hora a 37°C;

3. Observar, a cada 10 minutos, se houve precipitação.

Interpretação

A presença de Hb instável causa floculação nos primeiros 10 minutos, seguida de precipitação.

Precauções

1. as hemoglobinas normais permanecem estáveis durante todo o processo. Entretanto, pode ocorrer discreta precipitação em alguns casos, após 30-45 minutos. A Hb S é mais instável que a Hb A. A Hb A₂ é a hemoglobina mais estável entre as hemoglobinas humanas;
2. é necessário o uso de uma amostra controle, obtida nas mesmas condições que o teste;
3. a temperatura de 37°C, o pH 7,4 do tampão e a concentração de isopropanol são pontos críticos neste teste;
4. o diagnóstico de Hb instável deve ser confirmado por outros testes específicos: corpos de Heinz, eletroforese de hemoglobina, dosagem de metaemoglobina.

Dosagem de metaemoglobina por absorção espectrofotométrica

Princípio

A metaemoglobina é um subproduto resultante da transformação da oxiemoglobina. Essa transformação é decorrente da contínua oxidação da hemoglobina que ocorre notadamente devido ao envelhecimento e conseqüente apoptose do eritrócito. Entretanto outros fatores podem influenciar no aumento da concentração de metaemoglobina, por ex.: Hb

S (AS, SS, SC, SF), talassemias beta maior e menor, Hb instáveis, Hb M, oxidações induzidas pela deficiência de G-6PD, e oxidações “adquiridas” de medicamentos (ex.: sulfas, nitritos, Tc), alimentos, meio ambiente poluído (ex.: gases de NO_x e SO_x).

Reagentes

1 – Solução estoque de Tampão Fosfato M/15

Na ₂ HPO ₄ 12H ₂ O	9,0g
KH ₂ PO ₄	5,7g
H ₂ O q.s.p.	1,0 litro

2 – Solução trabalho de Tampão Fosfato M/60

Diluir 250 ml da solução estoque para 1 litro (q.s.p.) de água destilada.

Obs.: Conservar as soluções estoque e trabalho em refrigerador.

3 – Saponina a 1%.

Procedimento

Para cada análise usar dois tubos de hemólise identificados por A e B.

Tubo A: Colocar primeiramente 100µl de sangue total, coletado com anticoagulante e adicionar 100µl de saponina. Agitar para ocorrer hemólise. A seguir, adicionar 6 ml do tampão Fosfato M/60. Homogeneizar por inversão.

Tubo B: Colocar 300µl da mistura do tubo A e, a seguir, 3 ml do tampão Fosfato M/60. Homogeneizar por inversão.

Leituras espectrofotométricas

- a)** Ajustar o espectrofotômetro em **comprimento de onda 630 nm**, usar o tampão Fosfato M/60 como branco e acerto do zero da absorbância, e a seguir fazer a **leitura do tubo A**, anotando o valor da densidade óptica (D.O.).
- b)** Ajustar o espectrofotômetro em **comprimento de onda 540 nm**, usar o tampão Fosfato M/60 como branco e acerto do zero da absorbância, e a seguir fazer a **leitura do tubo B**, anotando o valor da densidade óptica (D.O.).

Cálculo

$$\% \text{ DE Meta Hb} = \frac{\text{D.O. 630 nm} \times 100}{\text{D.O. 630 nm} + (\text{D.O. 540 nm} \times 10)}$$

Obs.: O coeficiente **10** se deve à diluição realizada no tubo B (300µl do tubo A: 3 ml do tampão Fosfato).

Interpretação

A leitura do tubo A em 630 nm avalia a absorbância da metaemoglobina obtida da hemólise dos eritrócitos e diluída em solução tamponada. Por outro lado, a leitura B, sob as mesmas condições, em 540 nm avalia a absorbância da oxiemoglobina. Para obter sensibilidade técnica na leitura, a solução do tubo B foi diluída dez vezes.

Valores normais - Os valores normais para concentração de metaemoglobina variam de 0 a 4%. Acima de 4% se considera elevada.

Pesquisa intra-eritrocitária de Hb H

Princípio

A Hb H é uma hemoglobina anormal cuja molécula é formada somente por globinas beta, sendo portanto um tetrâmero β_4 , diferente da Hb A que é composta por um tetrâmero constituído por duas globinas alfa e duas globinas beta - $\alpha_2\beta_2$.

A Hb H se deve à diminuição de globinas alfa que ocorre na talassemia alfa, por isso as globinas beta se juntam e se tetramerizam.

Uma das formas de identificar a talassemia alfa é pesquisar a presença de Hb H nos eritrócitos. Para pesquisa-la é necessário induzir sua precipitação com o corante azul de crezil brilhante.

Reagentes

Corante de Azul de Crezil Brilhante

Azul de crezil brilhante.....	1,0g
Citrato de sódio	0,4g
Cloreto de sódio	0,8g
H ₂ O q.s.p.....	100ml

Procedimento

- 1) Colocar em um tubo de hemólise 100 μ l de sangue total com anticoagulante (EDTA, heparina, sequestrene ou ACD) e adicionar 200 μ l do corante Azul de Crezil Brilhante. Misturar com leve agitação.
- 2) Incubar em banho maria a 37°C por 30 a 40 minutos.
- 3) Após incubação fazer o esfregaço tradicional e pesquisar a presença de eritrócitos com Hb H na porção fina da lâmina.
- 4) A presença de uma ou mais células típicas de Hb H é indicativo da talassemia alfa.

IMPORTÂNCIA:

A talassemia alfa se deve a lesão parcial ou total de um, dois, três ou dos quatro genes alfa. Dessa forma, observa-se que sua manifestação clínica e laboratorial é muito heterogênea.

A forma mais comum em todo o mundo é a lesão de apenas um gene. Neste caso é difícil encontrar a Hb H precipitada nos eritrócitos, e na eletroforese a fração de Hb H está abaixo de 1%. O paciente não tem anemia devido a este tipo de talassemia alfa. A sua prevalência no Brasil varia de 10 a 20%.

A lesão de dois genes alfa causa maior precipitação de Hb H nos eritrócitos, é comum vê-los em todos os campos microscópicos, e na eletroforese de hemoglobina a fração de Hb H tem concentração entre 1 a 5%. Sua prevalência em nossa população é cerca de 3 a 6%, e causa discreto grau de anemia microcítica e hipocrômica.

Na lesão de três genes, as manifestações clínicas são evidentes pela anemia e esplenomegalia, enquanto as alterações laboratoriais apresentam anemia microcítica e hipocrômica de grau moderado (Hb: 9 a 10,0g/dl). Na eletroforese a Hb H tem concentrações acima de 5% (> 5% a 25%), e a pesquisa intraeritrocitária apresenta inúmeros eritrócitos com precipitados de Hb H. A frequência de tal. alfa com lesão de três genes alfa (ou doença de Hb H) é de 1:5.000 pessoas. Por fim, a lesão de quatro genes alfa quando parciais podem causar a doença de Hb H, mas quando as lesões são totais, fato que não sintetiza nenhuma globina alfa, o portador padece de hidropsia fetal, com morte fetal ou logo ao nascer, 100% dos seus eritrócitos tem precipitados de Hb Bart's (similar à Hb H). No Brasil há pouquíssimos casos relatados. É comum nas populações do sudeste asiático pelo fato da ocorrência de lesões genéticas nos dois genes alfa de um mesmo cromossomo 16.

Teste para avaliar a fragilidade osmótica dos eritrócitos

Princípio

Todos eritrócitos normais e anormais apresentam equilíbrio osmótico em soluções isotônicas de cloreto de sódio (NaCl) com concentração entre 0,8 e 0,9%. Contudo, há eritrócitos com defeitos na constituição protética da membrana que se comportam com mais fragilidade osmótica em relação aos eritrócitos normais. Esses eritrócitos mais frágeis hemolisam intensamente, a partir de soluções de NaCl com concentrações decrescentes: 0,6%, 0,5%, 0,4% e 0,3%. Para conhecer o grau de hemólise se faz a medida da fragilidade osmótica eritrocitária, bem como a curva de fragilidade osmótica.

A introdução desta técnica, muito utilizada em pesquisas relacionadas à doença da membrana eritrocitária, se deve ao fato de poder auxiliar o laboratório a identificar anemias hemolíticas que não sejam por hemoglobinopatias e talassemias. Além disso, é interessante destacar que os eritrócitos de pacientes com anemia falciforme e talassemias apresentam a fragilidade osmótica diminuída.

Reativos

1) Solução estoque de NaCl a 10%

NaCl	9,00gr
Na ₂ HPO ₄	1,36gr
NaH ₂ PO ₄ H ₂ O	0,27gr
H ₂ O q.s.p.	100ml

2) Soluções de NaCl com concentrações decrescentes de 0,9 a 0,1%.

A preparação dessas soluções se faz a partir da solução estoque de NaCl a 10%, conforme as seguintes diluições com água em balão volumétrico de 100ml.

Soluções de NaCl	Solução de NaCl a 10%	Adição	H ₂ O destilada
0,9	9 ml	+	91 ml
0,8	8 ml	+	92 ml
0,7	7 ml	+	93 ml
0,6	6 ml	+	94 ml
0,5	5 ml	+	95 ml
0,4	4 ml	+	96 ml
0,3	3 ml	+	97 ml
0,2	2 ml	+	98 ml
0,1	1 ml	+	99 ml

Procedimento

Sempre que for realizar o teste de fragilidade osmótica num paciente é necessário compará-lo com outra amostra “normal”, com sangue coletado nas mesmas condições (mesmo anticoagulante, mesmo dia).

Para cada tubo de hemólise identificado com a devida concentração de NaCl e os nomes dos analisados, proceder da seguinte forma:

- 1) 5ml de cada solução de NaCl (0,9 a 0,1%)
50µl de sangue bem homogeneizado
- 2) Homogeneizar os tubos por inversão (3 a 5 vezes), e deixá-los em repouso por 10 a 15 minutos à temperatura ambiente ($\pm 25^{\circ}\text{C}$).
- 3) Centrifugar todos os tubos por 5 minutos em 1500 a 2000 rpm.
- 4) Após a centrifugação transferir, por meio de pipeta Pasteur, o sobrenadante de cada tubo para outro correspondente devidamente identificado com as concentrações de NaCl e os nomes dos analisados.
- 5) Proceder a leitura espectrofotométrica de todos os sobrenadantes, em comprimento de onda 540nm (ou filtro verde), da seguinte forma:
 - a) Usar o sobrenadante do tubo com NaCl 0,9% de cada amostra analisada como branco (acerto do zero).

b) A partir do acerto do zero na escala de absorbância ou densidade óptica (D.O.), fazer a leitura de cada tubo. O valor da D.O. do sobrenadante do tubo com NaCl 0,1% corresponderá a 100% de hemólise, e a partir desse valor se calculará por meio de regra de três as hemólises de outros tubos.

c)

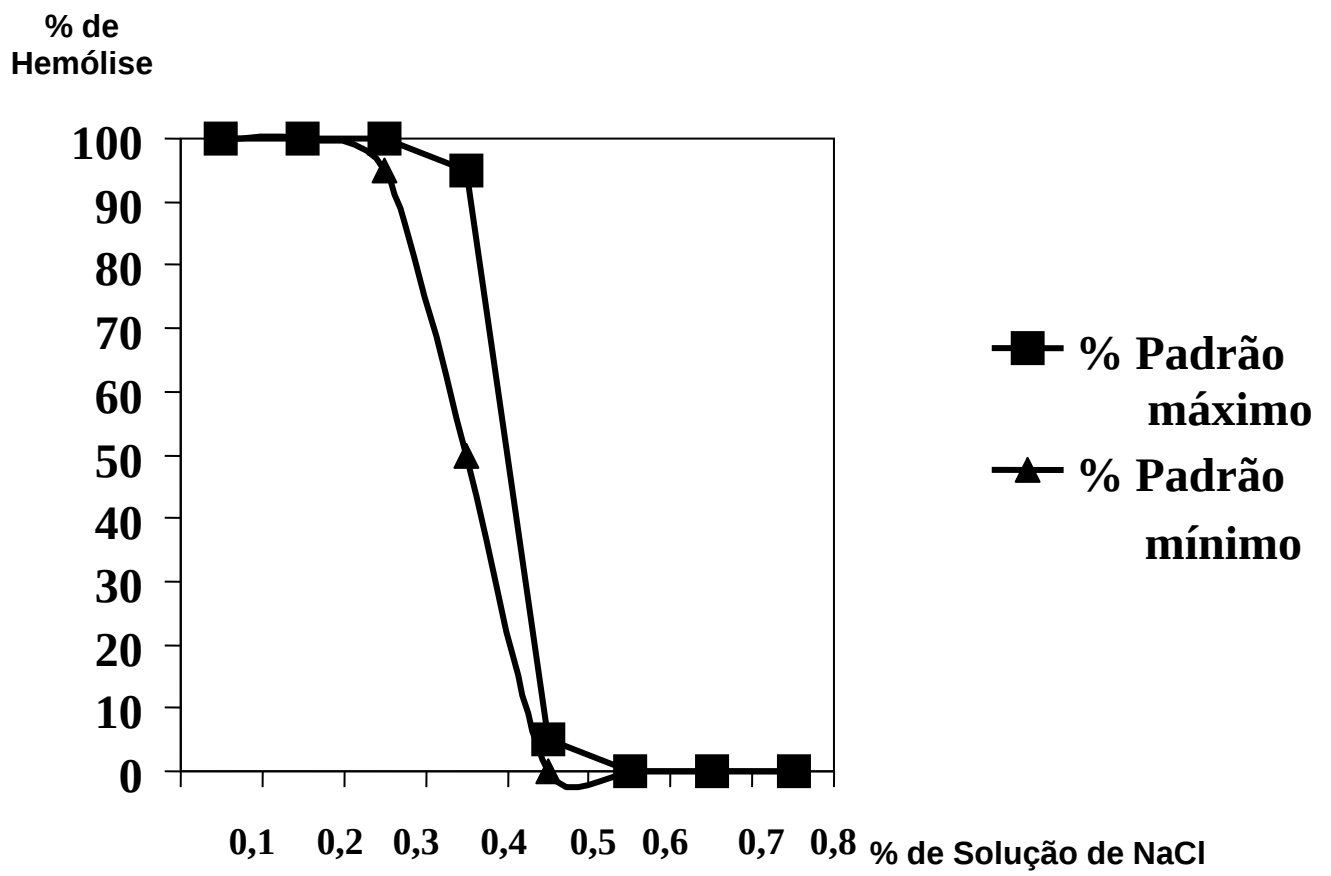
Ex: DO NaCl 0,1% ——— 100%
 DO NaCl 0,2% ——— X

$$X = \frac{\text{DO NaCl 0,2\%} \times 100}{\text{DO NaCl 0,1\%}}$$

VALORES NORMAIS:

% NaCl	% Lise Normal	% Lise na esferocitose
0,1	100	100
0,2	99 – 100	100
0,3	90 – 100	100
0,4	50 – 90	90 – 100
0,5	0 – 6	20 – 80
0,6	0	0 – 10
0,7	0	0
0,8	0	0

CURVA DE FRAGILIDADE OSMÓTICA



CAPÍTULO 12: PROTEÍNAS PLASMÁTICAS OU SÉRICAS

Introdução

As técnicas mais avançadas de identificação de proteínas indicam que no plasma humano existem cerca de 100 diferentes tipos de proteínas plasmáticas. Entretanto, na rotina usual de quase todos os laboratórios as proteínas plasmáticas são avaliadas em dois grupos: albuminas e globulinas (tabela 12.1). As análises desses dois grupos de proteínas que atendem ao interesse médico são efetuadas por técnicas bioquímicas que fornecem a concentração de **proteínas totais** em g/dL e por técnicas eletroforéticas ou cromatográficas que fracionam as diferentes proteínas do plasma e os resultados são apresentados em valores relativos (%) e absolutos (g/dL). Por fundamentos estritamente técnicos, especialmente para evitar a interferência do fibrinogênio nas avaliações quantitativas e nos fracionamentos eletroforéticos ou cromatográficos, é aconselhável usar o plasma “coagulado” ou soro, pois assim o fibrinogênio é consumido no processo de coagulação transformando-se em fibrina.

Tabela 12.1 – Principais proteínas plasmáticas de interesse clínico.

GRUPO	PROTEÍNAS ESPECÍFICAS
Albuminas	Albumina e Pré-albumina
Globulinas	Alfa-1: orosomucóide, α_1 antitripsina e α lipoproteína. Alfa-2: α_2 macroglobulina, haptoglobina, α_1 antiquimotripsina, globulina insolúvel e pré-beta lipoproteína. Beta: Transferrina, hemopexina, beta lipoproteína. Gama: Imunoglobulinas: IgA, IgM e IgG, Complemento e proteína C reativa.

Metabolismo normal

Ingestão – As proteínas entram em nosso corpo por meio da alimentação e no sistema digestório sofrem a hidrólise em aminoácidos no estômago e no intestino delgado. Para ocorrer esse processo de fragmentação protéica há a ação direta do ácido hidrocloreídrico e de pepsina no estômago, bem como de enzimas pancreáticas (tripsina, quimotripsina e carboxipeptidase) e enzimas intestinais (aminopeptidase) no intestino delgado. Cerca de 95% das proteínas da dieta são completamente degradadas em aminoácidos e somente uma pequena parte de polipeptídeos intermediários pode ser absorvida ou excretada pelas fezes.

Absorção – Os aminoácidos provenientes da degradação protéica são rapidamente absorvidos pelo intestino delgado e, geralmente, não são excretados pelas fezes.

Produção – Após a absorção, os aminoácidos são transportados pelo sangue para o fígado, sistema retículo endotelial e para todas as outras células do corpo onde ocorre síntese de proteínas. Das proteínas circulantes no sangue, a albumina, as alfa e beta-globulinas, a protrombina e o fibrinogênio, são formados no fígado. As gama-globulinas não são exclusivamente de origem hepática, mas são sintetizadas em todo o tecido reticuloendotelial do corpo humano. Uma pessoa com 70 quilos de peso produz e degrada cerca de 15 a 20 gramas de proteínas plasmáticas por dia, mantendo um equilíbrio dinâmico. Assim, uma pessoa adulta requer, em média, 0,5 grama de proteína por quilo de peso, por dia, incluindo certos aminoácidos essenciais.

Transporte e Funções – Uma vez sintetizadas, as proteínas plasmáticas são distribuídas pela corrente sanguínea para desempenhar suas diversas funções metabólicas. Normalmente, há de 6 a 8 gramas de proteínas plasmáticas por 100ml de sangue que contém 3,2 a 5 gramas de albumina; 0,7 a 1,3 gramas de alfa-globulinas; 0,6 a 1,1 gramas de beta-globulinas; e 0,7 a 1,5 gramas de gama-globulinas. Essas proteínas têm muitas funções úteis no corpo, servindo inclusive como substância

nutritiva para os tecidos na ocorrência de carência protéica. Além disso, atuam como tampões para o equilíbrio ácido-básico. Outra de suas importantes funções é a regulação da distribuição de água no organismo; essa atividade é realizada inicialmente pela albumina, que é responsável por cerca de 80% da pressão oncótica do plasma humano. A pressão oncótica é também conhecida por pressão osmótica coloidal e indica a pressão exercida pela albumina através da membrana celular. Essa pressão ajuda a transferência de água e solutos para o interior da célula. As proteínas desempenham, também, importante atividade no transporte de lipídeos plasmáticos, vitaminas, esteróides, hormônios tireóideos, metais (ferro, cobre, etc.) e certas enzimas. Especificamente, as gamaglobulinas contêm todos os anticorpos importantes, enquanto o fibrinogênio, protrombina e outras proteínas plasmáticas, participam da coagulação sanguínea. Finalmente, a proteína C reativa que é fracionada eletroforeticamente na região da gama globulina, é sintetizada no fígado e se caracteriza como excelente marcador não-específico que se eleva em resposta da fase aguda em situações provocadas por lesão tecidual causada por infecção, infarto ou malignidade (câncer).

Armazenamento – Diferentemente das gorduras, as proteínas não podem ser transferidas para qualquer tipo especial de célula. Entretanto, todas as células do organismo, particularmente aquelas do fígado, rim e intestinos, possuem proteínas lábeis que podem ser metabolizadas durante a desnutrição, fato que permite a manutenção energética do organismo por determinado período de tempo.

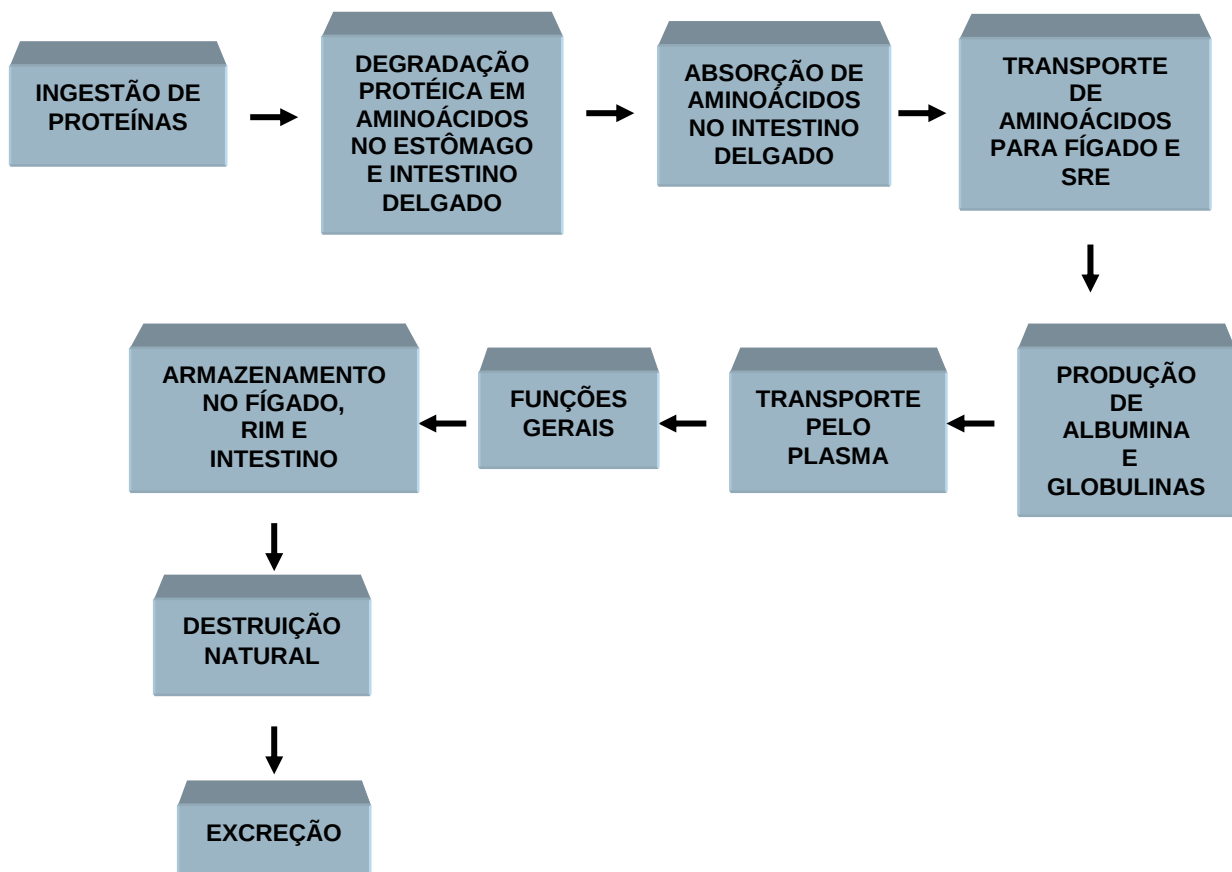
Destruição – As proteínas plasmáticas podem ser degradadas em aminoácidos por enzimas no fígado, os quais serão utilizados pelo organismo na produção de algumas substâncias essenciais, por exemplo: hormônios, enzimas, purinas ou pirimidinas; e também participam na formação de novas células. Os aminoácidos são utilizados para formar determinadas substâncias muito importantes, entre as quais se destacam o ácido pirúvico (formado a partir da alanina) e o ácido alfa-cetoglutâmico (sintetizado a partir do ácido glutâmico) que são introduzidos no ciclo de

Krebs. Os produtos finais do catabolismo protéico são: uréia, dióxido de carbono, água, ácido úrico, fosfato e creatinina.

Excreção – Somente uma mínima quantidade de proteínas e aminoácidos é excretada normalmente, o restante é filtrado através dos glomérulos e reabsorvido quase que completamente. Entretanto, aminoácidos e proteínas aparecem na urina em várias condições patológicas. A degradação de produtos de proteínas (uréia, dióxido de carbono, água, etc.) é excretada através da urina e dos pulmões.

Regulação – As proteínas, inclusive as plasmáticas, são quebradas constantemente em aminoácidos e re-sintetizadas a seguir. Todos os fatores que atuam nesse equilíbrio ainda não são conhecidos, mas entre eles se sabe que fazem parte os aminoácidos provenientes de alimentos e de certos hormônios (hormônios de crescimento, corticosteróides, andrógenos, tireóide e insulina).

Sinopse Metabólica



Avaliação laboratorial

As proteínas plasmáticas são estudadas em sangue coletado sem anticoagulante e, dessa forma, separa-se o soro. As proteínas plasmáticas podem ser avaliadas de forma integral – ou proteínas totais, por meio de métodos bioquímicos (turbidimetria, floculação, química seca), imunológicos ou por ultracentrifugação. Quando se quer avaliar os componentes específicos das proteínas – ou frações de proteínas, se utiliza com maior frequência os métodos eletroforéticos em gel de agarose, acetato de celulose ou eletroforese capilar.

A determinação das proteínas é de grande auxílio na avaliação do estado nutricional e da presença de doenças sistêmicas agudas ou crônicas.

A dosagem isolada de proteínas totais tem pouco valor, já que a alteração em uma das frações pode ser compensada por alteração oposta de outra fração, por exemplo: no processo inflamatório agudo há diminuição da albumina e elevação da alfa-2 globulina, sem que o valor de proteínas totais esteja alterado. Entretanto, há casos específicos em que o valor de proteínas totais tem utilidade médica como são os casos de significativas elevações no mieloma múltiplo, ou na diminuição acentuada que ocorre nos estados graves de desnutrição, na síndrome nefrótica, etc.

As dosagens bioquímicas das frações albumina e gama globulina auxiliam na orientação diagnóstica em alterações sistêmicas com diminuição de albumina, como nos estados carenciais (subnutrição), perdas renais, distúrbios intestinais e hepáticos; ou nas elevações de gama globulina que ocorrem nas gamopatias (mieloma múltiplo, doença de Waldestron) e nos processos infecciosos crônicos.

O fracionamento eletroforético das proteínas plasmáticas, juntamente com a dosagem de proteínas totais, oferece um quadro completo, muitas vezes específico para determinadas patologias e outras vezes como excelente marcador biológico para o acompanhamento do estado clínico do paciente. A eletroforese padrão para proteínas

plasmáticas nos oferece o fracionamento básico de cinco frações: albumina, alfa-1, alfa-2, beta e gama globulinas.

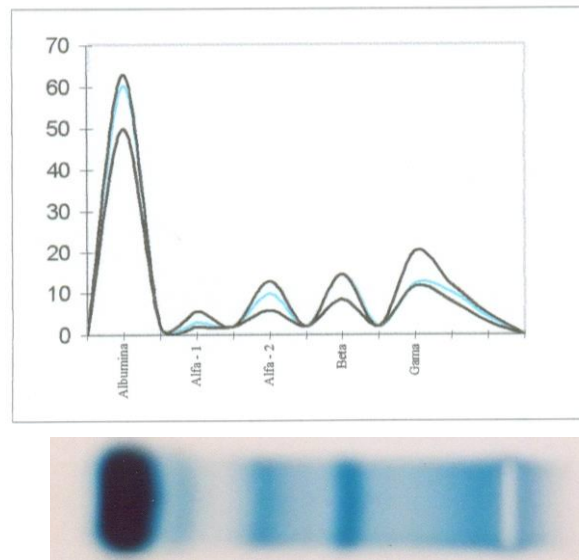
Os valores médios de proteínas totais e frações estão apresentados na tabela 12.2.

Tabela 12.2 – Valores médios normais (mínimo e máximo) das concentrações das proteínas plasmáticas avaliadas no soro. Proteínas totais e frações.

Proteínas*	%	g/dL
Totais	100	6,0 a 8,0
Albumina	50,0 a 63,0	3,2 a 5,5
Alfa-1	2,5 a 5,7	0,2 a 0,4
Alfa-2	5,8 a 13,0	0,5 a 0,9
Beta	8,5 a 14,7	0,6 a 1,1
Gama	11,8 a 20,2	0,7 a 1,5

(*) Os valores relativos e absolutos apresentam ligeiras variações entre diferentes reagentes bioquímicos e tipos de eletroforeses.

Interpretação do traçado eletroforético – Na maior parte das condições patológicas que envolvem as proteínas plasmáticas, as alterações abrangem não somente uma determinada proteína, mas um grupo razoavelmente amplo dos componentes protéicos. Assim, as análises eletroforéticas mantêm uma posição de considerável utilidade clínica quando as análises específicas de suas frações são confrontadas com as avaliações médicas. Para se fazer a correta interpretação dos resultados obtidos no traçado eletroforético é necessário ter conhecimento dos seus valores normais (tabela 12.2).



Traçado eletroforético das proteínas séricas com os limites mínimos e máximos da normalidade.

Imunoglobulinas – As imunoglobulinas são anticorpos específicos compostos por glicoproteínas e estão presentes no plasma e nos líquidos orgânicos. No plasma, quando fracionadas eletroforeticamente, compõem o grupo das gama globulinas, mas podem também ser detectadas na região de beta globulinas. Até alguns anos atrás a identificação das imunoglobulinas se fazia por meio de imunoeletroforese. Atualmente há métodos imunológicos mais rápidos e sensíveis como: imunoturbidimetria, eletroquimioluminescência, radioimunoensaio e Elisa, capazes de quantificar com sensibilidade as imunoglobulinas IgA, IgE, IgD, IgG e IgM. Cada uma dessas imunoglobulinas tem concentrações e funções diferentes em nosso organismo, conforme mostra a tabela 12.3.

Tabela 12.3 – Característica das imunoglobulinas humana.

Tipo	Concentração	Função Principal	Método
Ig G *	70 a 75%	Resposta imune secundária	IMT
Ig M	5 a 10%	Combate às infecções	IMT
Ig A	10 a 15%	Primeira linha de defesa	IMT
Ig D	< 1%	Receptores para Ag em Linfócito B	IEF
Ig E	< 0,5%	Imunidade ativa em alergias	EQL

IMT: imunoturbidimetria; IEF: imunoeletroforese; EQL: eletroquimioluminescência.

* A IgG tem cinco sub-grupos – IgG1 a IgG5.

CAPÍTULO 13: PROTEÍNAS PLASMÁTICAS DE INTERESSE CLÍNICO

Introdução

Cerca de 100 tipos diferentes de proteínas plasmáticas foram identificadas até o presente utilizando-se de técnicas sofisticadas e de alta sensibilidade. Entretanto, os métodos eletroforéticos e cromatográficos disponíveis para a investigação clínica permitem o fracionamento de cinco a sete frações: albumina, alfa-1, alfa-2, beta e gama, em geral, e pode ocorrer o sub-fracionamento de alfa-2 em duas frações, da beta globulina em duas frações, do complemento C3 na interzona beta-gama, e da proteína C-reativa na região distal da zona de gama. A figura 13.1a mostra o fracionamento padrão das proteínas séricas e as figuras 13.1b a 13.1e mostram as frações que raramente são fracionadas em eletroforese de rotina.

O uso de procedimentos eletroforéticos de alta resolução para as proteínas plasmáticas ou séricas, notadamente em gel de poliacrilamida e focalização isoeletrica, permitiram identificar várias proteínas que estão incluídas nas cinco zonas básicas de albumina, alfa-1, alfa-2, beta e gama, conforme mostra a tabela 13.1.

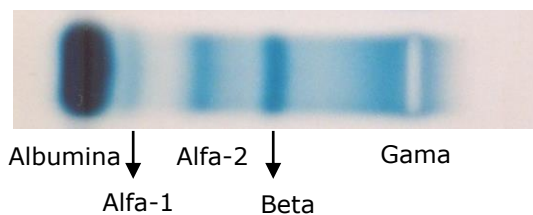


Figura 13.1a: Padrão normal com cinco frações: Albumina, alfa-1, alfa-2, beta e gama.

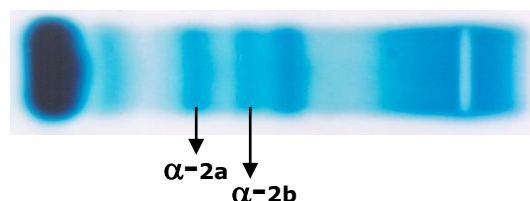


Figura 13.1b: Fracionamento com seis frações: Albumina, alfa-1, alfa-2a, alfa-2b, beta e gama*.

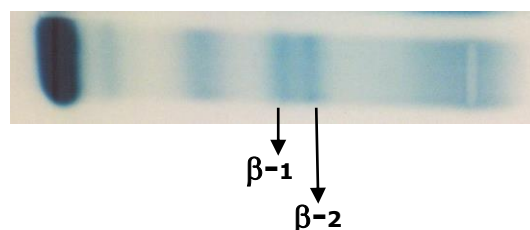


Figura 13.1c: Fracionamento com seis frações: Albumina, alfa-1, alfa-2, beta-1, beta-2 e gama.

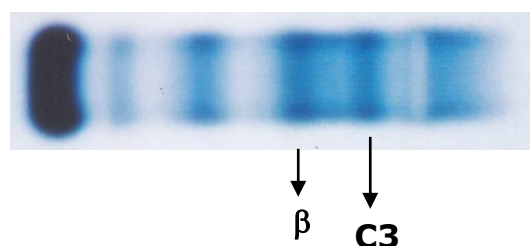


Figura 13.1d: Fracionamento com seis frações: Albumina, alfa-1, alfa-2, beta, complemento C3 e gama.

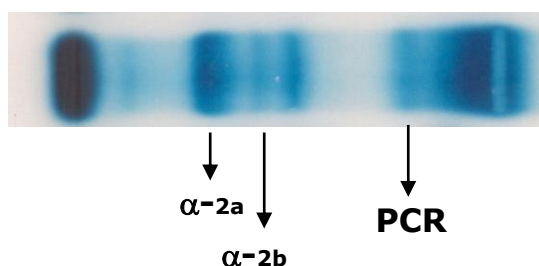


Figura 13.1e: Fracionamento com sete frações: Albumina, alfa-1, alfa-2a, alfa 2-b, beta, gama e proteína C reativa (PCR).

Tabela 13.1 – Componentes protéicos das cinco zonas fracionadas em eletroforese de proteínas.

Zonas	Componentes Protéicos
Albumina	Pré-albumina e Albumina
Alfa-1	Alfa-1 glicoproteína ácida, orosomucóide, alfa-1 antitripsina, alfa-lipoproteína
Alfa-2	Alfa-2 macroglobulina, haptoglobina, ceruloplasmina, alfa-1 antiqumotripsina, globulina insolúvel e pré-beta lipoproteína
Beta	Transferrina, hemopexina, beta lipoproteína, IgA, complemento C3
Gama	IgM, IgG, proteína C reativa e fibrinogênio (visível somente no plasma)

Componentes específicos

Pré-albumina – É uma banda fraca e espalhada, com migração eletroforética mais rápida que a albumina e por essa razão foi denominada por pré-albumina. Sua concentração normal é variável entre 5 e 7% ou 0,3 e 0,5 g/dL. Sua principal função está relacionada com o transporte do hormônio tireóideo, entretanto o significado clínico desta proteína não está relacionado com sua propriedade fisiológica. Diante desse fato a diminuição da Pré-albumina é observada nos processos inflamatórios agudos de etiologia diversa, porém, mais interessante é a diminuição precoce e marcante que se associa à insuficiência das células hepáticas. Assim, a pré-albumina é um indicador hepatocelular de mais utilidade que a albumina, cujas modificações são constantes e tardias. Por outro lado, elevações da pré-albumina estão relacionadas com herança genética familiar, sem que tenha evidenciado significados com patologias específicas (figura 13.2). De forma geral, a pré-albumina pela sua pouca resolatividade eletroforética não tem sido considerada nas análises de

eletroforeses de proteínas. Apesar disso, o interesse científico deverá desvendar no futuro outras relações com a pré-albumina, pois o fracionamento em gel de poliacrilamida revela que a pré-albumina é composta por pelo menos cinco sub-frações, conforme mostra um fracionamento obtido em nosso laboratório (figura 13.3).



Figura 13.2: Fracionamento de proteínas séricas por meio de eletroforese em acetato de celulose com alta resolução em hidragel. A foto mostra um caso com pré-albumina elevada (8% de concentração).

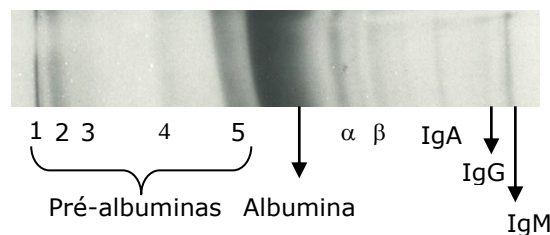


Figura 13.3: Fracionamento de proteínas séricas por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida. Observe os subfracionamentos da pré-albumina em cinco pequenas frações além dos fracionamentos de IgA, IgG e IgM na zona de gama globulina.

Albumina – É a proteína com maior concentração no fracionamento das proteínas séricas ou plasmáticas (50 a 63% e 3,2 a 5,0 g/dL). As principais funções estão relacionadas com a atividade osmótica do plasma e a função específica do transporte de produtos de várias substâncias endógenas e exógenas, bilirrubina, ácidos graxos, corantes, cálcio e fármacos. A união com algumas substâncias, principalmente em casos de bilirrubinemia, modifica a carga elétrica da albumina, e isto se evidencia

durante a eletroforese em que é possível observar uma fração de cor amarela (bilirrubina + albumina) que se destaca da própria albumina. Ao corar a eletroforese, a albumina associada ao conjugado de bilirrubina + albumina se revela como uma fração discretamente alongada (albumina rápida) em direção ao ânodo ou pólo positivo. A diminuição acentuada da concentração de albumina tem importantes significados clínicos, quer seja pela baixa síntese desta proteína no fígado (ex. hepatopatias), ou por acentuadas perdas: renal (ex. síndrome nefrótica), intestinal (ex. enteropatias) e cutânea (ex. queimaduras graves). Outras situações de diminuição discreta a moderada da concentração de albumina ocorrem nos processos inflamatórios agudos, subnutrição, má absorção e caquexia neoplásica. O aumento de albumina, por sua vez, se destaca em situações de hipogamaglobulinemia em que há intenso desequilíbrio da relação albumina/globulina (figura 13.4).



Figura 13.4: Agamaglobulinemia ou ausência de gama (eletroforese superior) desequilibra a relação albumina/globulinas e evidencia a supremacia quantitativa de albumina.

Alfa-1 globulina – Apesar desta fração ser composta por quatro proteínas específicas (ver tabela 13.1), somente a alfa-1 antitripsina é responsável pela sua revelação com os corantes usuais de eletroforese (Ponceau, Negro de Amido e Azul de Bromofenol). Esta proteína é o componente mais importante entre os “inibidores de proteases”, termo usado para um grupo de proteínas que tem a função de neutralizar as atividades das

enzimas proteolíticas, seja de natureza bacteriana ou leucocitária. Por essa razão a alfa-1-globulina aumenta sua concentração nos processos inflamatórios agudos. O comportamento desta fração é muito peculiar nas hepatopatias crônicas e agudas; em fases de consolidação da doença ocorre a elevação da alfa-1-antitripsina, e que tende a diminuir nas fases terminais da cirrose hepática. Por outro lado a deficiência hereditária de alfa-1-atitripsina, que se traduz em visível diminuição e até completa ausência da fração alfa-1 na eletroforese, é devido a uma variante genética desta proteína capaz de causar graves lesões fibrosantes do tecido pulmonar (enfisema na fase de adolescência e em adultos jovens), ou cirrose hepática na infância (figura 13.5).

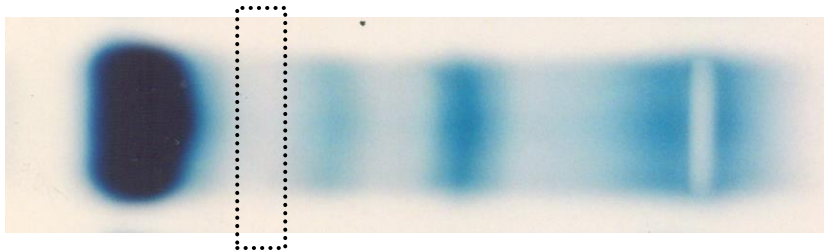


Figura 13.5: Completa ausência da fração alfa-1 globulinas (linha pontilhada) em paciente com enfisema pulmonar crônico desde a adolescência.

Alfa-2-Globulina – Essa zona é determinada principalmente por duas proteínas (alfa-2-macroglobulina e haptoglobina) entre outras expostas na tabela 13.1. A alfa-2-macroglobulina, apesar de fazer parte dos “inibidores de proteases” tem interesse clínico específico, por exemplo sua elevação constante em pacientes com a síndrome da deficiência imunológica adquirida (AIDS). Por outro lado, o aumento fisiopatológico desta fração protéica ocorre por retenção seletiva durante a síndrome nefrótica e, por essa razão, é visível sua elevação em grau acentuado enquanto que a albumina principalmente, e outras globulinas são excretadas pela urina. A figura 13.6a mostra um caso com síndrome nefrótica em comparação com a figura 13.6b de uma amostra normal.

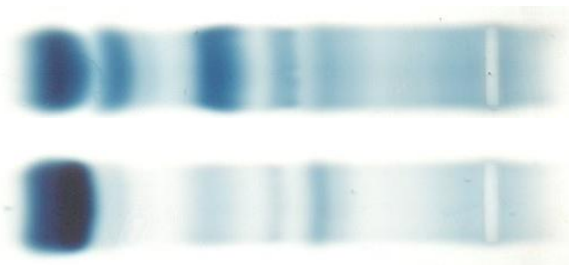


Figura 13.6a

Figura 13.6b

Figura 13.6a: Eletroforese de proteínas séricas de amostra obtida de um paciente com síndrome nefrótica. Observar a diminuição de albumina e as elevações de alfa-1 e alfa-2 globulina. Esta última pode alcançar até 30% da concentração. **Figura 13.6b:** Fracionamento normal.

A diminuição da alfa-2 macroglobulina tem impacto na diminuição da fração de alfa-2 globulina, e essa situação pode ser observada nas hepatopatias crônicas de fase avançada, pois a síntese desta proteína ocorre no fígado.

A haptoglobina, por sua vez, tem interesse clínico como sensível marcador de hemólises. Como se sabe, a haptoglobina forma um complexo protéico com a hemoglobina livre plasmática e que, posteriormente, é removido do sangue pelo processo de fagocitose efetuado por macrófagos. Assim, nas síndromes hemolíticas, a haptoglobina é intensamente requisitada para se ligar às moléculas de hemoglobinas livres e, esse fato, causa sua marcante diminuição, com reflexo na queda de concentração de alfa-2-globulina. O aumento da haptoglobina acontece nos processos inflamatórios agudos, pois ela é considerada como uma das proteínas da fase aguda, e, portanto, nestes eventos patológicos ocorre a elevação da fração de alfa-2-globulina (figuras 13.7a e 13.7b).



Figura 13.7a

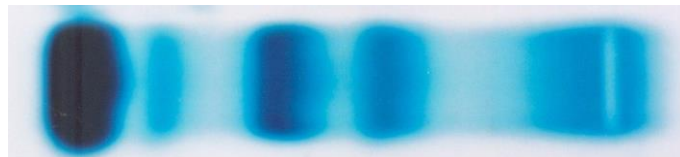


Figura 13.7b

Figura 13.7a: Fracionamento normal. **13.7b:** Elevações de alfa-1 e alfa-2 em processo inflamatório agudo.

Beta globulina – Esta zona do traçado eletroforético é composta por várias proteínas (tabela 13.1) das quais a transferrina e o complemento C3 são as mais importantes sob o ponto de vista do significado clínico. Tecnicamente, a adição de 100mg de cálcio em um litro do tampão de eletroforese permite a separação dessas duas proteínas em beta-1 e beta-2 globulinas, respectivamente. A transferrina é sintetizada nas células hepáticas e sua função é o transporte do ferro plasmático, portanto, a elevação de sua concentração com reflexo no aumento da fração beta globulina é indicativo de carência de ferro. A diminuição da transferrina se observa nas hepatopatias crônicas.

O significado funcional do componente C3 do sistema complemento é bem conhecido, pois atua como mediador em numerosas reações imunitárias. Assim, a elevação do complemento C3 induz o aumento de beta globulina em processos infecciosos crônicos. Entretanto, a fração beta globulina elevada pode também indicar hiperlipidemia devido à beta lipoproteína ou LDL-colesterol (tabela 13.2).

Destaque deve ser dado à elevação monoclonal, geralmente acentuada na zona beta globulina devido ao acúmulo de síntese de

imunoglobulina IgA em pacientes com mieloma múltiplo. Apesar de ser classificada como uma gamopatia, a IgA tem mobilidade eletroforética entre as frações gama e beta, e muitas vezes – dependendo da sua estrutura molecular – na própria zona de beta, conforme mostra a figura 13.8.

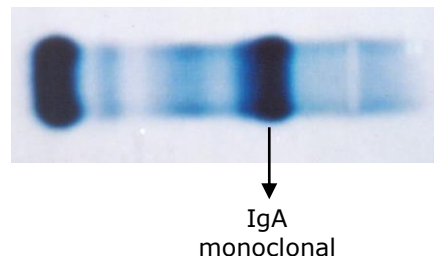


Figura 13.8: Mobilidade de IgA em gamopatia monoclonal na zona de beta globulina.

Gama globulina – A zona de gama globulina compreende todas as classes de imunoglobulinas, com destaque à IgG. A heterogeneidade molecular que caracteriza as imunoglobulinas não impede a migração em forma de uma banda compacta, apesar de visualmente mostrar-se esparsamente bem delimitada. A disposição esparsa caracteriza que vários clones de linfócitos B e plasmócitos estão sintetizando todas as classes e sub-classes de imunoglobulinas e, por essa razão, denomina-se de banda policlonal (figuras 13.9, 13.10 e 13.11).

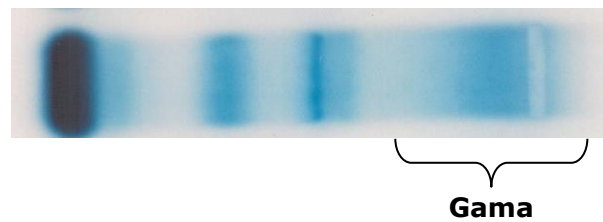


Figura 13.9: Fracionamento normal, com a zona de gama globulina espalhada, porém bem delimitada. A concentração relativa de gama globulina nesta eletroforese é de 18,4% (normal: 11,8 a 20,2%).

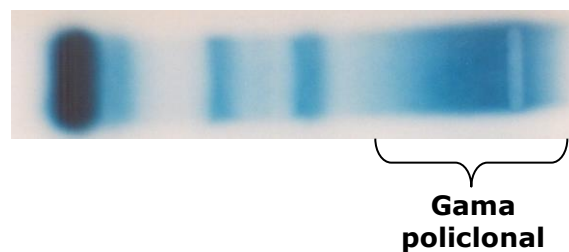


Figura 13.10: Fracionamento com elevação de gama com **distribuição policlonal** em paciente com virose. A concentração relativa de gama globulina nesta eletroforese é de 26,8% - elevação policlonal moderada da fração gama.

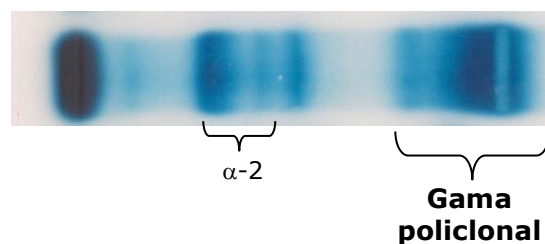


Figura 13.11: Fracionamento com elevação de gama com **distribuição policlonal** em paciente com processo inflamatório crônico. A concentração relativa de gama globulina nesta eletroforese é de 35,5% - elevação policlonal acentuada da fração gama. Observar elevação da Alfa-2 globulina, comum em casos de inflamação crônica.

As gamopatias monoclonais determinadas por IgA, IgM e IgG ocupam posições distintas na ampla delimitação que caracteriza a zona de gama globulina. A IgA é a mais anódica, muitas vezes migrando na zona eletroforética de beta globulina (figura 13.12). A IgM é menos anódica e se posiciona discretamente além do ponto de aplicação na interzona beta-gama (figura 13.3). Por fim, a IgG ocupa efetivamente a região média de delimita a zona de gama globulina, algumas vezes em direção catódica (figura 13.14). É importante destacar que, apesar dos progressos verificados no fracionamento eletroforético das proteínas séricas ou plasmáticas, não é possível determinar com certeza se a fração monoclonal é IgA, IgM ou IgG. Para esta finalidade é necessário que se façam dosagens imunológicas específicas das imunoglobulinas ou imunoeletroforese com anti-soros específicos para estas imunoglobulinas.

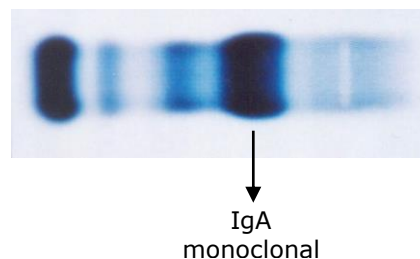


Figura 13.12: Gamopatia monoclonal na zona de beta globulina que sugere ser IgA.

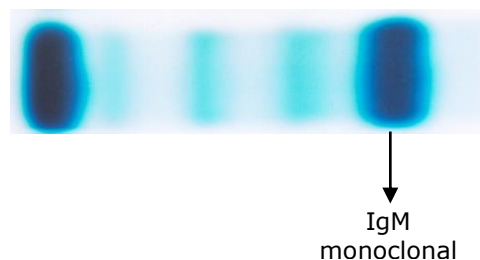


Figura 13.13: Gamopatia monoclonal na inter-zona beta-gama globulina que sugere ser IgM.



Figura 13.14: Gamopatia monoclonal na própria região de gama globulina que sugere IgG.

Finalmente há situações em que inexiste a delimitação entre as zonas de beta e gama globulinas. Nesses casos, o traçado gráfico mostra apenas quatro picos densitométricos: albumina, alfa-1, alfa-2 e fusão beta-gama. Manualmente é possível delimitar no gráfico as concentrações aproximadas de beta e de gama globulinas fundidas. Essa disposição de fusão beta-gama ocorre com frequência em eletroforeses de soro e plasma de pacientes que padecem de cirrose hepática (figura 13.15).

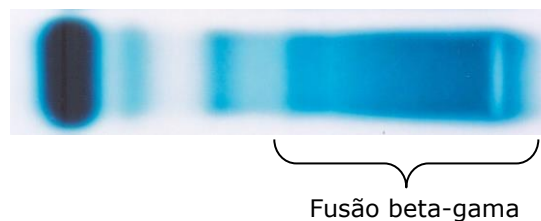


Figura 13.15: Eletroforese de proteínas séricas com destaque à disposição que caracteriza a fusão beta-gama.

Alterações eletroforéticas induzidas por patologias ou artefatos

As variações de concentrações de proteínas séricas podem ser resultantes das consequências fisiopatológicas de diversas doenças e dos graus de lesões patológicas que afetaram o organismo do paciente (tabela 13.2). Além disso, algumas frações de proteínas séricas e plasmáticas podem sofrer influências de compostos e sub-compostos químicos de drogas medicamentosas, capazes de causarem alterações quantitativas artefatuais das frações. Da mesma forma as alterações artefatuais podem decorrer também da estocagem inadequada do soro e plasma, do tipo de eletroforese utilizada, do corante, etc. A tabela 13.3 resume as principais alterações artefatuais e induzidas por situações estruturais, físico-químicas e adquiridas.

Tabela 13.2 – Relação entre alterações das proteínas séricas e plasmáticas com situações padrões e doenças frequentemente associadas.

Situação padrão	Alterações eletroforéticas	Doenças associadas
Inflamação aguda	• Albumina normal ou diminuída • Elevações de alfa-1 e alfa-2 globulinas	• Infecções agudas • Doenças inflamatórias
Inflamação crônica	• Albumina normal ou diminuída • Elevações de alfa-1 e alfa-2 globulina • Elevação policlonal de gama globulina	• Doenças autoimunes • Doenças hepáticas crônicas • Infecções crônicas • Câncer
Hipoalbuminemia	• Albumina diminuída	• Câncer metastático • Desnutrição • Doenças que induzem perda protéica
Hipogama globulinemia	• Albumina normal ou diminuída (*) • Diminuição de gama globulina	• Imunodeficiência congênita • Doenças linfoproliferativas • Inflamações intestinais
Gamopatia policlonal	• Elevação de gama globulina	• Doença auto-imune • Infecções • Doenças hepáticas
Cirrose	• Aumento de gama globulina	• Cirrose hepática
Perda protéica	• Albumina diminuída (*) • Alfa-1 diminuída (*) • Alfa-2 diminuída(*) • Beta diminuída (*) • Gama diminuída (*)	• Síndrome nefrótica (**) • Doenças exudativas da pele • Gastroenteropatias
Gamopatias monoclonais	• Albumina normal ou diminuída • Elevação monoclonal de gama globulina	• Mieloma múltiplo • Macroglobulinemia • Leucemia linfocítica crônica • Linfoma
Deficiência de alfa-1 anti-tripsina	• Ausência de alfa-1 globulina	• Deficiência de alfa-1 anti-tripsina • Enfisema pulmonar precoce
Hiper beta globulinemia	• Albumina normal ou diminuída • Aumento de beta globulina	• Anemia por deficiência de ferro • Hiperlipidemia • Diabetes mellitus

(*) valor absoluto

(**) na síndrome nefrótica ocorre elevações relativas (%) de alfa-1 e alfa-2 globulinas e diminuição das demais frações (ver fig. 13.6 a).

Tabela 13.3 – Interferentes que alteram o fracionamento e as concentrações das proteínas séricas (ou plasmáticas).

Interferentes	Alterações
Tipos de eletroforese	A eletroforese por focalização isoelétrica influi na concentração de albumina , tornando-a menos concentrada quando comparada com outros tipos de eletroforeses.
Soro hemolisado e Anemias hemolíticas	Em situações de hemólises a albumina se mostra mais concentrada, diminui a concentração de alfa-2-globulina por consumo de haptoglobina e induz o aparecimento de uma fração entre alfa-2 e beta globulinas (globulina insolúvel).
Soro icterico e Bilirrubinemias	Situações comuns em anemias hemolíticas e hepatites: a albumina se mostra mais concentrada.
Tempo de estocagem do soro	Quanto maior o tempo a fração beta globulina diminui a sua concentração devido à decomposição de complemento C3.
Doenças de cadeia gama pesada	Ocorre a presença de uma fração do tipo monoclonal que pode ocupar qualquer espaço entre a alfa-2 e gama globulinas.
Inflamações agudas	É possível observar a Proteína C Reativa (PCR) na região anódica da zona de gama globulina.
Uso de plasma em lugar de soro	O fibrinogênio aparece entre a região de beta-2 e gama nas eletroforeses em agarose, e atrás da aplicação e distante da zona de gama nas eletroforeses em acetato de celulose.

CAPÍTULO 14: DOENÇAS RELACIONADAS COM ALTERAÇÕES DAS PROTEÍNAS SÉRICAS E TRAÇADO ELETROFORÉTICO.

1 – DOENÇA RELACIONADA À DIETA REDUZIDA DE PROTEÍNAS

1.1 – Desnutrição grave

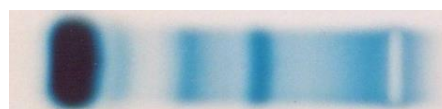
A diminuição significativa da ingestão de proteínas e outros nutrientes interferem na síntese das proteínas plasmáticas com notável diminuição das concentrações de albumina e das globulinas. Outros testes complementares são necessários para obter maiores informações sobre o estado nutricional de um paciente desnutrido. Entre as análises usuais destacam-se o hemograma, especialmente a série vermelha, urinálise, glicose sanguínea, colesterol, ácido úrico e creatinina. Além desses exames, outros testes específicos podem determinar a gravidade da desnutrição, com destaques para ferritina, ferro sérico, vitamina B₁₂ e ácido fólico.

Sinopse Fisiopatológica



Sumário das Dosagens de Proteínas

Proteínas totais:	Diminuída
Albumina:	Diminuída
Globulinas:	Diminuída
Alfa-1:	Diminuída
Alfa-2:	Diminuída
Beta:	Diminuída
Gama:	Diminuída



Padrão Normal



O traçado eletroforético é aparentemente normal na desnutrição grave, porém os valores absolutos estão todos diminuídos.

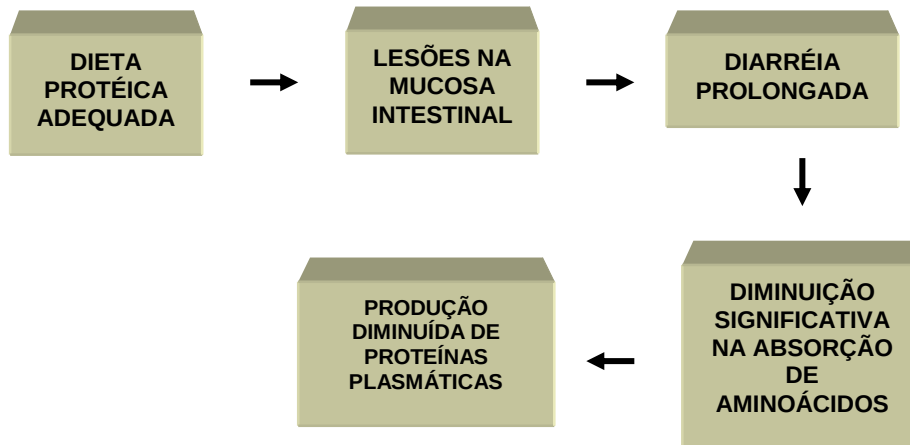
2 – DOENÇAS RELACIONADAS À PERDA PROTÉICA

As perdas protéicas se revelam no exame laboratorial por meio da dosagem de proteínas totais e do fracionamento eletroforético. Nessas situações são visíveis as diminuições das proteínas totais e de várias de suas frações. Por essa razão é possível fazer a distinção entre as condições patológicas que causam a perda protéica e daquela induzida por processos secundários. Na perda protéica por via intestinal ocorre a diminuição conjunta da albumina e de todas as frações de globulinas. Por outro lado, na queimadura e na síndrome nefrótica as perdas de proteínas não são uniformes.

2.1 – Perda gastrointestinal

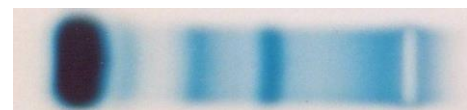
A excessiva perda gastrointestinal de albumina, juntamente com outras proteínas séricas, tem sido observada em diversas alterações gastrointestinais, como são os casos de diarreia prolongada, síndrome da mal absorção, lesões da mucosa do intestino delgado (doença celíaca) ou esteatorréia causada por pancreatite crônica, entre outras. Dessa forma, a perda de proteínas por meio da excreção de fezes é muito significativa e, conseqüentemente, interfere na oferta de aminoácidos para a síntese de proteínas. Em outros casos, a albumina pode ser perdida devido a uma patologia secundária da própria mucosa intestinal, ou pela perda direta do plasma através dos intestinos como ocorre nas doenças inflamatórias intestinais. Todas essas perdas protéicas podem ser moderadas ou graves e há situações em que são acompanhadas de subnutrição, fato que induz, além da hipoproteinemia generalizada, uma marcante diminuição de albumina e transferrina.

Sinopse Fisiopatológica



Sumário das Dosagens de Proteínas

Proteínas totais:	Diminuída
Albumina:	Diminuída
Globulinas:	Diminuída
Alfa-1:	Diminuída
Alfa-2:	Diminuída
Beta:	Diminuída
Gama:	Diminuída



Padrão normal

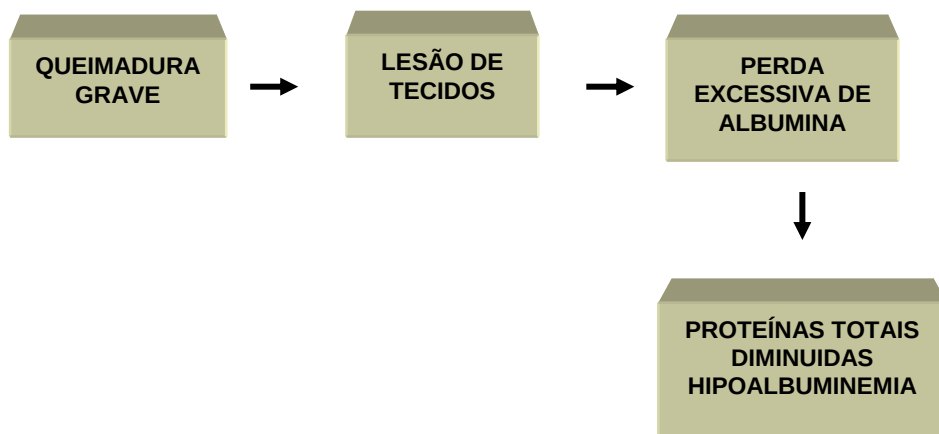


Visível diminuição de albumina e de transferrina na região de beta globulina em situação de perda protéica gastrointestinal.

2.2 – Queimaduras graves

Em pacientes com queimaduras graves pode ocorrer evidente diminuição de albumina sérica. Da mesma forma como ocorre em outras condições, a hipoalbuminemia é sintomática, havendo o envolvimento de vários fatores. Um desses fatores, certamente o mais importante, é a perda excessiva de albumina por infiltração do plasma nas áreas lesadas pela queimadura. A explicação para esse fato é que a pele, apesar de representar cerca de 6% do peso de uma pessoa, contém entre 30 a 40% da albumina extravascular.

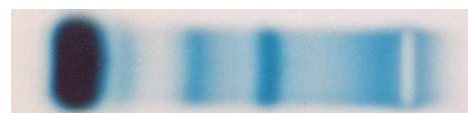
Sinopse Fisiopatológica



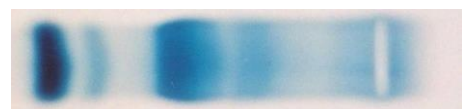
Sumário das Dosagens de Proteínas

Proteínas totais:	Diminuída
Albumina:	Muito Diminuída
Globulinas:	Diminuída
Alfa-1:	Normal ou Aumentada (V.R.)
Alfa-2:	Normal ou Aumentada (V.R.)
Beta:	Diminuída ou Normal (V.R.)
Gama:	Diminuída

V.R.: Valor relativo



Padrão Normal

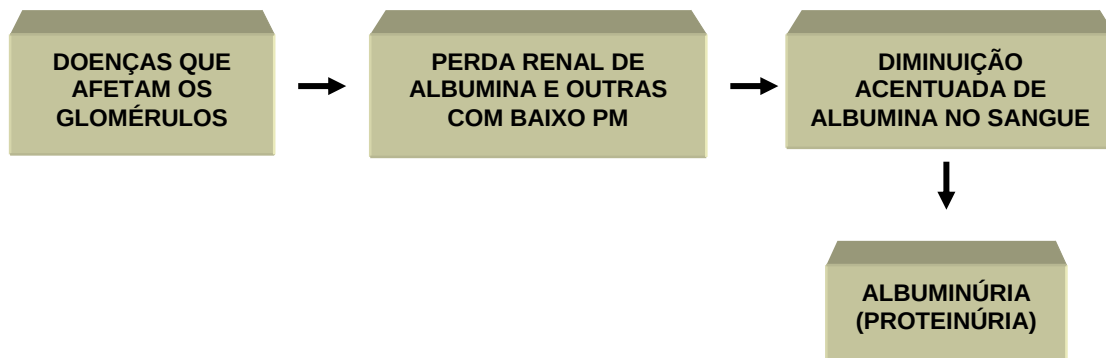


Excessiva diminuição de albumina e elevações relativas de alfa-1 e alfa-2 em perda protéica por queimadura grave.

2.3 – Síndrome nefrótica

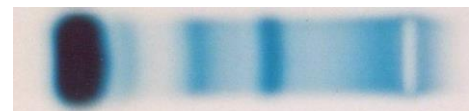
A síndrome nefrótica se caracteriza por sinais e sintomas manifestados pela perda de grande volume de albumina pelos rins, fato que se manifesta por hipoproteinemia, edema, lipidúria, hiperlipemia e proteinúria. Essas manifestações advêm de várias doenças diferentes, notadamente a glomerulonefrite, amiloidose, diabetes mellitus, lúpus eritematoso e outras doenças do colágeno. Assim, além da perda de albumina e outras proteínas de baixo peso molecular (ex.: transferrina e alfa 1 – antitripsina) observa-se, por outro lado, a retenção de algumas proteínas de grande peso molecular (ex.: α_2 macroglobulinemia, IgM e lipoproteínas). Por essa razão, o fracionamento eletroforético apresenta a globulina alfa-2 muito elevada em contraste com o decréscimo de albumina e gama globulina. Eventualmente a fração beta globulina também pode estar elevada.

Sinopse Fisiopatológica



Sumário das Dosagens de Proteínas

Proteínas totais:	Diminuída
Albumina:	Muito diminuída
Globulinas:	Diminuída ou normal
Alfa-1:	Diminuída
Alfa-2:	Muito aumentada (V.R.)
Beta:	Normal ou aumentada (V.R.)
Gama:	Diminuída



Padrão Normal



Diminuição de albumina e excessiva elevação relativa de alfa-2 globulina na perda protéica por síndrome nefrótica.

Obs.: Excessiva excreção de proteína pela urina (>7,0g/dL)

3 – DOENÇAS RELACIONADAS A HEPATOPATIAS

O fígado é o órgão em que ocorre a síntese de albumina, e situações patológicas que interferem na sua estrutura e no seu metabolismo afetam o nível de albumina no organismo. Entretanto, pelo fato do fígado ter considerável capacidade regenerativa, somente nos casos em que houve avançado grau de lesão hepatocelular a concentração de albumina se torna significativamente diminuída. Dessa forma, os três problemas hepáticos que alteram o perfil das proteínas séricas são:

- 1) Doenças crônicas do fígado, com destaque à cirrose hepática, que se manifesta com marcante elevação de IgG e IgM associada à diminuição da albumina e transferrina.
- 2) Hepatite viral aguda, com elevações de IgG e IgM.
- 3) Destruição biliar, geralmente associada à elevação de C4 e beta lipoproteínas.

3.1 – Cirrose hepática

A cirrose está entre as dez principais causas de óbito no mundo ocidental. Grande parte dos casos de cirrose se deve ao abuso de álcool (60-70%), hepatites virais (10%), doenças biliares (5 a 10%) e sobrecarga de ferro (5%) entre outras causas de menor importância. Todas as formas iniciais de cirrose podem ser clinicamente assintomáticas. Ao se tornar sintomática as manifestações clínicas são inespecíficas pois se caracterizam pela perda de apetite, perda de peso, fraqueza, osteoporose e, na forma avançada, debilitação expressiva. O metabolismo hepático se torna comprometido pelo desarranjo estrutural do seu parênquima, alterando o funcionamento maciço das células hepáticas. Por essas razões a síntese de albumina diminui enquanto, ao mesmo tempo, ocorre uma superatividade do sistema reticuloendotelial, especificamente das células plasmáticas (linfócitos B), que resulta no aumento da concentração de gama globulina. Na cirrose alcoólica há variáveis graus

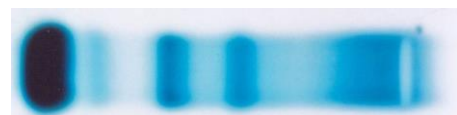
de incorporação de frações protéicas da beta globulina na região de gama fato que no fracionamento eletroforético se mostra pela fusão das frações beta-gama. Por outro lado, na cirrose biliar, a albumina permanece normal nos estágios iniciais embora ocorra acentuada hipergamaglobulinemia e hiperbetaglobulinemia.

Sinopse Fisiopatológica



Sumário das Dosagens de Proteínas

Proteínas totais:	Normal ou Aumentada
Albumina:	Diminuída
Globulinas:	Elevada
Alfa-1:	Normal
Alfa-2:	Normal ou diminuída
Beta:	Aumentada (*)
Gama:	Aumentada (*)



Padrão Normal



Observar a fusão beta-gama globulinas (elevadas) na hepatopatia por cirrose hepática.

* pode ocorrer fusão beta-gama em uma só fração eletroforética.

3.2 – Hepatites virais

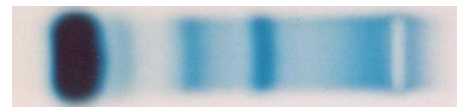
Os vírus ao atacarem as células hepáticas induzem a sua falência metabólica e as tornam necróticas. Nesse estado de progressiva desestabilização biológica, as células hepáticas se tornam incapazes de sintetizar albumina. Por essa razão a albumina diminui sensivelmente no plasma sanguíneo. Ao mesmo tempo ocorre elevação de globulinas plasmáticas devido à resposta imunológica e produção de anticorpos específicos contra os vírus da hepatite. As globulinas alfa-2 e beta também se elevam. As alterações da concentração plasmática da albumina ocorrem no início do estado icterício, atingindo a hipoalbuminemia ao longo de 8 a 16 dias. Geralmente, observa-se a normalização da síntese de albumina quando seu nível sérico atinge valores padrões entre cinco e seis semanas após o início da hepatite. O prolongamento da hipoalbuminemia além de seis semanas é sugestivo de necrose maciça, hepatite crônica ou cirrose pós-necrótica. Nessas complicações a albumina plasmática apresenta importante significado no prognóstico do paciente, capaz, inclusive, de supor a extensão do processo destrutivo das células hepáticas. A hipergamaglobulinemia ocorre geralmente precedendo a icterícia, atingindo os valores máximos entre 8 a 10 dias após a doença ter sido diagnosticada. O retorno da concentração de gama globulina aos níveis de normalidade demora entre três e quatro meses. É importante destacar que a concentração de gama globulina é um excelente marcador da gravidade e progressão da doença.

Sinopse Fisiopatológica

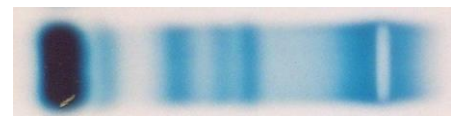


Sumário das Dosagens de Proteínas

Proteínas totais:	Normal ou Aumentada
Albumina:	Diminuída
Globulinas:	Aumentada
Alfa-1:	Normal
Alfa-2:	Aumentada
Beta:	Aumentada ou Normal
Gama:	Aumentada



Padrão normal



Elevações de alfa-2, beta e gama globulinas na hepatite viral.

4 – ALTERAÇÕES DAS PROTEÍNAS PLASMÁTICAS NOS PROCESSOS INFLAMATÓRIOS

A maior parte das proteínas plasmáticas participa da resposta inflamatória, dada a frequência desse processo fisiopatológico nas mais diversas patologias. Essas proteínas participam com grande evidência laboratorial na fase inflamatória aguda e que pode durar de 24 horas a uma semana. Nesse processo destacam-se a diminuição de albumina e o aumento das globulinas, em especial das frações alfa-1 e alfa-2. Na realidade o que ocorre são alterações dos componentes protéicos que compõem a alfa-1 globulina (alfa-1 anti-tripsina e alfa-1 glicoproteína ácida) e alfa-2 globulina (haptoglobina, alfa-1 antitripsina, ceruloplasmina) além do fibrinogênio, proteína C e complemento C (todos na região de gama globulina).

Na fase inflamatória aguda, geralmente as imunoglobulinas permanecem no limite da normalidade, entretanto, se verifica a elevação de suas frações à medida que ocorre a cronificação do processo inflamatório. Alguns quadros que se diferenciam das alterações acima apresentadas podem ser úteis na conclusão do diagnóstico, como por exemplo, a **proteína C reativa**. Essa proteína é um dos mais sensíveis e precoces marcadores de processos inflamatórios da fase aguda, pois se torna aumentada, com exceção das infecções virais.

4.1 – Inflamação aguda

A rápida destruição de tecidos que ocorre nos processos inflamatórios agudos se caracteriza por resposta bioquímica localizada (ativação do complemento) e pela resposta da imunidade celular efetuada pela mobilização de neutrófilos, monócitos e células dendríticas (fagócitos, em geral). Essa resposta imunológica induz o aumento na síntese de proteínas, especialmente de imunoglobulinas que compõem a região de

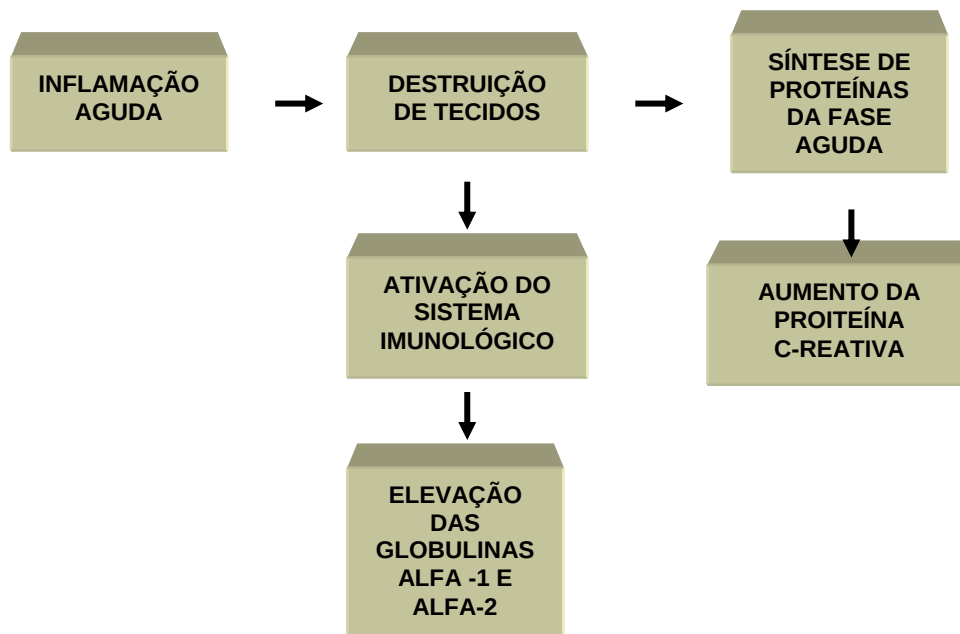
gama globulina. As evidências clínicas e laboratoriais que estão associadas à inflamação aguda são:

- febre, resultante da liberação de substâncias tóxicas que estimulam o sistema nervoso central.
- hemossedimentação acelerada devido ao aumento das globulinas alfa-1 e alfa-2 e do fibrinogênio.
- leucocitose, devido à atividade fagocítica
- proteínas da fase aguda aumentadas, pelo acúmulo da proteína C-reativa, alfa-2 macroglobulina, ceruloplasmina, alfa-1 antitripsina e haptoglobina.

A elevação da concentração das proteínas da fase aguda é observada nas seguintes doenças:

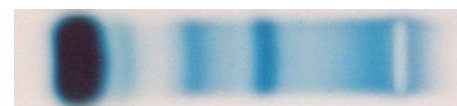
- a) **infecções agudas**: causadas por bactérias ou parasitas;
- b) **traumas**: físicos, químicos ou cirúrgicos;
- c) **insuficiência cardíaca**;
- d) **coma metabólico**: uremia, choque, etc.

Sinopse Fisiopatológica

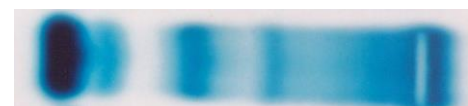


Sumário das Dosagens de Proteínas

Proteínas totais:	Normal / Aumentada
Albumina:	Diminuída
Globulinas:	Aumentada
Alfa-1:	Aumentada
Alfa-2:	Aumentada
Beta:	Normal ou Aumentada
Gama:	Normal ou Aumentada



Padrão normal



Albumina diminuída e elevações de alfa-1 e alfa-2 globulinas na inflamação aguda.

4.2 – Inflamação crônica

A inflamação crônica está associada com o aumento de algumas proteínas conhecidas por “proteínas da fase crônica”. Eletroforeticamente, a resposta do organismo frente à inflamação crônica pode ser vista pelo aumento da alfa-2 globulina e discreto aumento da beta globulina, fato que ocorre devido à elevação do complemento. A albumina pode estar discretamente diminuída e a fração gama elevada tem distribuição policlonal. As proteínas da fase crônica podem estar alteradas nas seguintes doenças:

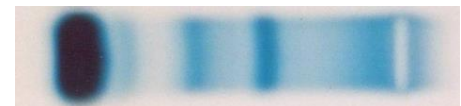
- infecções crônicas (brucelose, tuberculose, etc)
- alergias
- câncer
- doenças auto-imunes

Sinopse Fisiopatológica



Sumário das Dosagens de Proteínas

Proteínas totais:	Normal ou Aumentada
Albumina:	Diminuída
Globulinas:	Aumentada
Alfa-1:	Aumentada
Alfa-2:	Aumentada
Beta:	Normal ou Aumentada
Gama:	Aumentada



Padrão normal



Fracionamento típico de inflamação aguda: alfa-1, alfa-2 e gama elevadas.

5 – ALTERAÇÕES GENÉTICAS DAS PROTEÍNAS PLASMÁTICAS

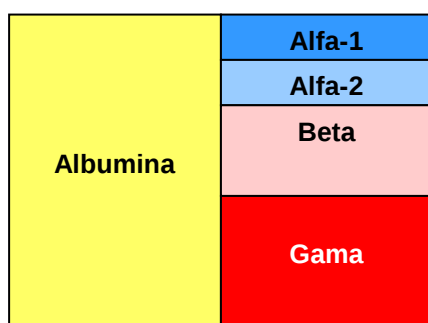
As alterações genéticas que envolvem os genes para síntese de albumina e globulinas podem ter causas hereditárias ou adquiridas durante a gestação (congenita). Essas alterações geralmente ocorrem no sentido de diminuir a síntese de proteínas e entre as doenças que se destacam apresentaremos três, quais sejam: disproteinemia familiar idiopática, hipogamaglobulinemia e deficiência de Alfa-1 antitripsina.

5.1 – Disproteinemia familiar idiopática

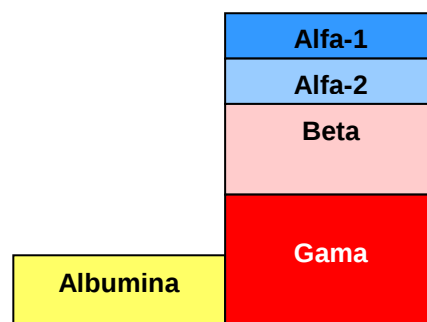
Nessa condição há acentuado decréscimo na síntese de albumina com conseqüente diminuição dessa proteína no plasma. Por outro lado, as globulinas que continuam sendo sintetizadas normalmente se apresentam com valores relativos elevados quando comparadas com a albumina.

Sinopse Fisiopatológica

Genes normais para albumina e globulinas



Gene deficiente para albumina e normal para globulinas



Sumário das Dosagens de Proteínas

Proteínas totais:	Diminuída
Albumina:	Diminuída (VA e VR)
Globulinas:	Aumentada (VR)
Alfa-1:	Aumentada (VR)
Alfa-2:	Aumentada (VR)
Beta:	Aumentada (VR)
Gama:	Aumentada (VR)

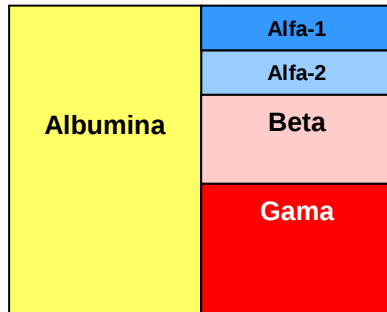
Obs.: VA: valor absoluto; VR: valor relativo.

5.2 – Hipogamaglobulinemia

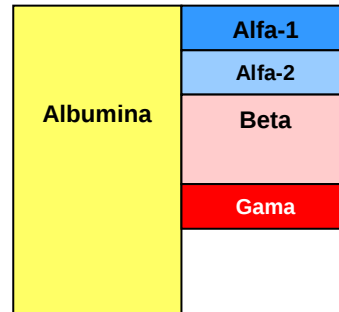
A diminuição da concentração gama globulina se deve ao decréscimo da síntese de uma ou mais imunoglobulinas, fato que decorre das imunodeficiências como é o caso da síndrome de Wiskott Aldrich, ou da hipoglobulinemia infantil ligada ao cromossomo X e da hipoglobulinemia transitória. A diminuição da síntese de gama globulinas pode ser, também, de causa seletiva, por exemplo: deficiência seletiva das cadeias leves “kapa” ou “lambda”. A maioria dessas alterações que resultam em hipogamaglobulinemia é de causa hereditária e, por isso, se manifesta desde a infância. Outras deficiências de imunoglobulinas são adquiridas principalmente na fase adulta e podem ser secundárias à leucemia, doença de Hodgkin e gamopatias monoclonais, e finalmente há as hipogamaglobulinemias causadas por terapia imuno-supressivas. O preciso diagnóstico requer análises imunológicas para se conhecer o(s) tipo(s) de imunoglobulina(s) envolvida(s).

Sinopse Fisiopatológica

Genes normais para albumina e globulinas

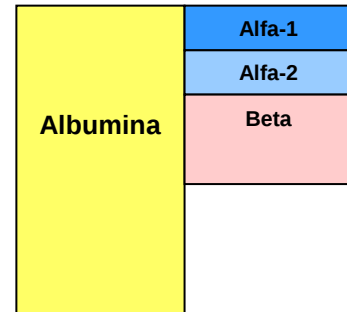


Gene gama deficiente
Demais genes normais



Hipogamaglobulinemia

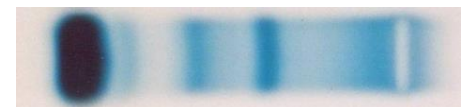
Gene gama ausente.
Demais genes normais



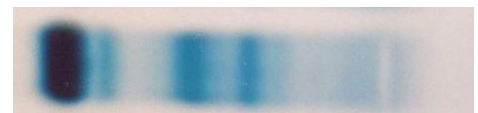
Agamaglobulinemia

Sumário das Dosagens de Proteínas

Proteínas totais:	Normal ou Diminuída
Albumina:	Normal ou Aumentada
Globulinas:	Diminuída
Alfa-1:	Normal
Alfa-2:	Normal
Beta:	Normal
Gama:	Muito diminuída ou ausente (agamaglobulinemia)



Padrão normal



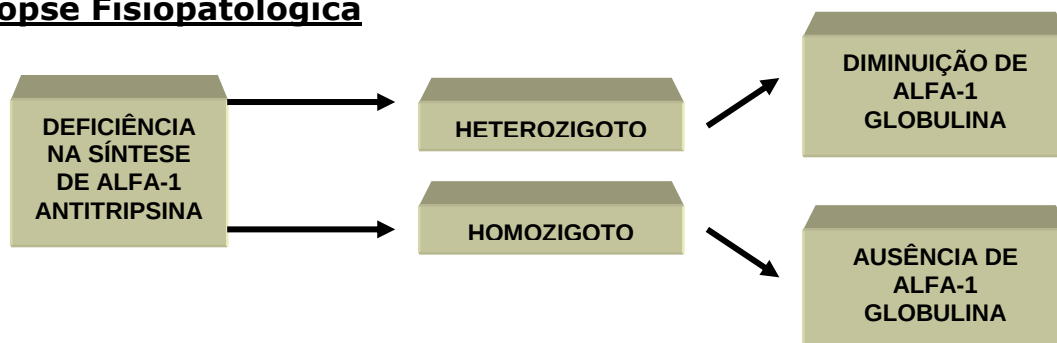
Diminuição de gama globulina e demais frações normais na hipogamaglobulinemia.

5.3 – Deficiência de alfa-1-antitripsina

Há duas causas que induzem a deficiência de alfa-1 antitripsina: a hereditária e a adquirida. A deficiência de origem hereditária se manifesta nas formas homozigota e heterozigota. Aproximadamente 95% da população tem concentrações de alfa-1

antitripsina variáveis entre 200 e 400mg/dL. Na forma heterozigota há brusca queda da concentração de alfa-1 antitripsina em 30 a 50% dos níveis normais. Na forma homozigota a deficiência varia conforme o grupo étnico, mas geralmente a concentração dessa proteína representa apenas 10 a 15% da concentração padrão. Essa condição é observada em 3 a 5% da população mundial e os portadores homozigotos têm predisposição ao enfisema pulmonar, cirrose hepática, insuficiência pancreática e outras anormalidades. A deficiência adquirida pode ser encontrada em pacientes com doenças hepáticas ou síndrome nefrótica grave. A avaliação por meio da eletroforese mostra ausência total ou acentuada diminuição da fração alfa-1 globulina (fig. 13.5). Porém o diagnóstico preciso se faz por meio de dosagem bioquímica específica ou imunológica de alfa-1 antitripsina.

Sinopse Fisiopatológica



Sumário das Dosagens de Proteínas

Proteínas totais:	Normal
Albumina:	Normal
Globulinas:	Normal
Alfa-1:	Diminuída ou ausente
Alfa-2:	Normal
Beta:	Normal
Gama:	Normal

6 – GAMOPATIAS MONOCLONAIS

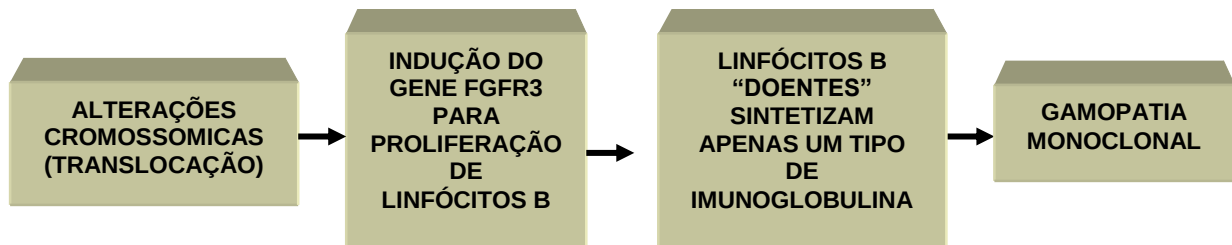
As gamopatias monoclonais representam doenças provenientes de alterações da síntese de imunoglobulinas, consistindo de uma proliferação de linfócitos B e plasmócitos. Essas células sintetizam de forma descontrolada um ou dois tipos de imunoglobulinas por meio da exarcebação reprodutiva de um clone celular (monoclonal) ou de dois clones (biclonal). O mieloma múltiplo é o tipo mais comum de gamopatia monoclonal. Um outro tipo de gamopatia monoclonal, porém de rara frequência, é a macroglobulinemia de Waldenstrom que produz excessiva quantidade de IgM.

6.1 – Mieloma múltiplo

Uma das principais características obtidas em análise laboratorial do soro de paciente com mieloma múltiplo é o fracionamento eletroforético do tipo monoclonal, com a visão de uma fração muito densa, na região da gama globulina. Ocasionalmente essa fração densa, muitas vezes com intensidade igual ou maior que a albumina, se posiciona na região de beta ou de alfa-2 globulina. Para esses pacientes se faz necessário o uso de técnicas imunológicas (imunoeletroforese ou dosagens específicas de imunoglobulinas) para se saber qual o tipo de imunoglobulina que está induzindo à elevação de gama globulina. Muitas vezes é possível supor qual o tipo de imunoglobulina causadora do mieloma múltiplo em eletroforese de proteínas de alta resolução. Nessas eletroforeses a IgG migra na região gama, a IgA migra na região pré-gama (entre beta e gama) e a IgM migra na região de beta. A imunoglobulina mais comum em mieloma é a IgG em 2/3 dos casos, seguida da IgA em 1/3; a IgM é raríssima e a IgD também já foi descrita em casos muito raros. Um teste urinário conhecido por proteinúria de Bence-Jones está presente em 2/3 dos casos e se deve à passagem de cadeias leves “livres” através da filtração glomerular para serem

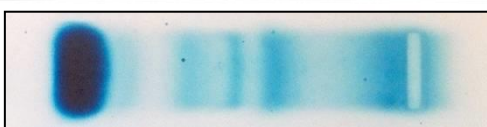
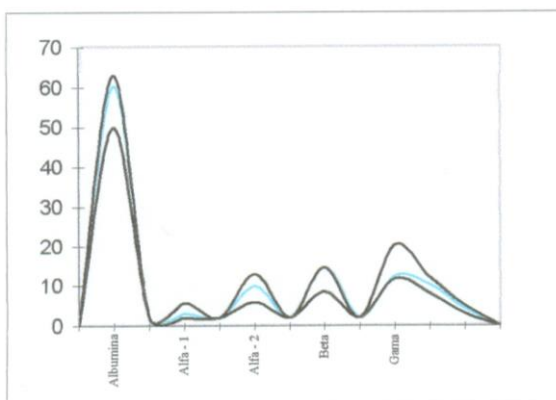
excretadas na urina. Vários outros exames auxiliares (mielograma, radiografia, hemossedimentação, cálcio, uréia e creatinina) são fundamentais para o diagnóstico e acompanhamento dessas doenças.

Sinopse Fisiopatológica

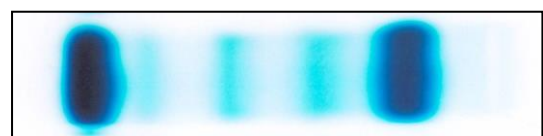
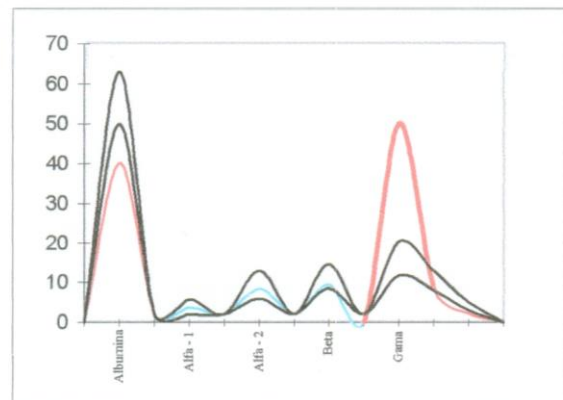


Sumário das Dosagens de Proteínas

Proteínas totais:	Normal ou Aumentada
Albumina:	Diminuída
Globulinas:	Aumentada
Alfa-1:	Normal
Alfa-2:	Normal
Beta:	Normal
Gama:	Aumentada (pico monoclonal)



Normal



Mieloma Múltiplo

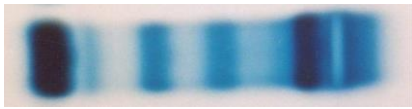
Outras alterações eletroforéticas em gamopatias



Fração monoclonal de gama na região de IgG (atrás da aplicação)



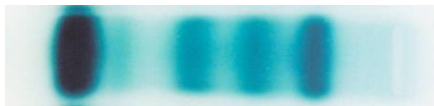
Fração monoclonal de gama na região de IgG (na frente da aplicação)



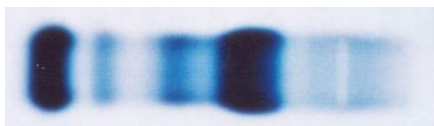
Transformação (fase inicial) de fração monoclonal de gama na região de IgG (na frente da aplicação)



Fração monoclonal de gama na região de IgM (interzona beta-gama)



Transformação (fase inicial) de fração monoclonal de gama na região de IgM (interzona beta-gama)



Fração monoclonal de gama na região de IgA (zona de beta globulina)

CAPÍTULO 15: TÉCNICAS LABORATORIAIS PARA ANÁLISES DAS PROTEÍNAS SÉRICAS OU PLASMÁTICAS

Co-autor: Paulo Francisco Francisco Naoum

Cristiane Gutierrez Toledo Goulart

Introdução

As solicitações por parte dos médicos para o fracionamento de proteínas séricas ou plasmáticas tem aumentado consideravelmente nos últimos anos. Provavelmente esse fato seja decorrente da qualidade dos resultados emitidos pelos laboratórios e, por essa razão, tem contribuído de forma positiva para auxiliar o diagnóstico clínico de diversas patologias diferentes. Como resposta à exigência de qualidade analítica, o mercado de tecnologias para eletroforeses, notadamente aquele direcionado às aplicações em clínica médica, prospera e oferece novos equipamentos e metodologias sofisticadas. Por essas razões se torna difícil descrever técnicas para eletroforeses com as especificidades com que foram destacadas nas duas primeiras edições do livro Eletroforese, Técnicas e Diagnósticos (Editora Santos, São Paulo, 1990 e 1999), e que serviu de inspiração para a presente publicação.

Os três tipos de eletroforeses atualmente disponíveis para as análises de proteínas séricas ou plasmáticas avaliam a disposição por zonas das cinco frações proteicas: albumina, alfa-1 globulina, alfa-2 globulina, beta globulina e gama globulina. Esses três tipos de eletroforeses se desenvolvem em metodologias conhecidas por seus suportes de separação: acetato de celulose, gel de agarose e capilaridade em gel. As eletroforeses em acetato de celulose e em gel de agarose podem ser efetuadas por técnicas não automatizadas (ou manuais) e também por técnicas automatizadas com diversos graus de sofisticação. A eletroforese por capilaridade em gel somente pode ser desenvolvida por meio de técnicas automatizadas com alto grau de sofisticação tecnológica.

É evidente que as condições econômicas entre os laboratórios que se dispõem a realizar eletroforeses são muito variáveis e, muitas vezes, um pequeno laboratório poderá fornecer resultados do fracionamento eletroforético de proteínas séricas ou plasmáticas com a mesma sensibilidade de um laboratório de referência, mesmo usando técnicas não automatizadas.

Por essa razão optamos por apresentar três procedimentos técnicos tradicionais para o fracionamento de proteínas séricas ou plasmáticas em acetato de celulose, em gel de ágar (ou agarose) e em gel de poliacrilamida.

Eletroforese em acetato de celulose

Princípios

O acetato de celulose é uma membrana branca obtida da reação da celulose com anidrido acético, ácido acético e ácido sulfúrico. O resultado da confecção da membrana de acetato de celulose permite que as proteínas aplicadas em sua superfície sejam absorvidas uniformemente em seus microporos. O desenvolvimento da corrida eletroforética induz a passagem de íons através da composição química do acetato de celulose, com homogeneidade de distribuição e com baixo efeito eletroendosmótico.

Para o fracionamento das proteínas séricas ou plasmáticas se utilizam tiras de acetato de celulose medindo 2,5 ou 5,0 cm de largura e comprimentos variáveis entre 5 e 12 cm. Há dois tipos de acetato de celulose: o seco e o gelatinizado. O acetato gelatinizado deve ser conservado em solução de metanol a 40% para não perder suas propriedades físico-químicas.

A eletroforese em acetato de celulose permite que após todos os procedimentos técnicos (fracionamento, coloração e descoloração) seja transparentizada para a leitura densitométrica.

Reagentes

1. **Solução tampão veronal-Tris 0,05 M pH 8,8***

Dietil-barbiturato sódico (barbital sódico)	10,30 g
Ácido dietil-barbitúrico	1,84 g
Tris (hidroximetil) aminometano	7,20 g
Água destilada q.s.p.	1000ml

* Além desta solução tampão apresentaremos outras – os tampões optativos que podem ser usados com a mesma eficiência analítica.

2. **Solução corante: Ponceau S**

Ponceau vermelho S	1,0 g
Ácido tricloroacético	37,5 g
Ácido sulfosalicílico	37,5 g
Água destilada q.s.p.	500ml

3. **Solução descorante de ácido acético a 5%**

Ácido acético glacial	50ml
Água destilada q.s.p.	1000ml

4. **Solução eluente para quantificação espectrofotométrica**

Ácido acético glacial	80ml
Água destilada q.s.p.	100ml

5. **Solução de transparentização**

Metanol	87ml
Ácido acético glacial	12ml
Glicerol	1ml

Material

1. Aparelho para eletroforese
2. Aplicador de amostras
3. Tiras de acetato de celulose
4. Vasilhas para embeбimento de acetato de celulose, coloração e descoloração das proteínas
5. Papel absorvente
6. Pinça para manipular o acetato durante coloração, descoloração e transparentização.

Procedimento

1. Colocar igual quantidade de solução tampão em cada compartimento eletrolítico da cuba de eletroforese.
2. Embeber o acetato de celulose na solução tampão, previamente colocada numa vasilha, pelo menos durante 15 minutos. Evitar o embeбimento prolongado, acima de 4 horas.
3. Enxugar o acetato de celulose entre duas folhas de papel absorvente para remover o excesso da solução tampão.
4. Ajustar as tiras de acetato de celulose na cuba de eletroforese, deixando-as esticadas. Verificar se as suas extremidades estão mergulhadas na solução tampão de cada compartimento da cuba.
5. Aplicar 3 a 5µl do soro do paciente, a 2cm do extremo catódico.
6. Passar 150 volts por 20 a 30 minutos. O tempo exato deverá ser estabelecido após algumas corridas eletroforéticas.
7. Remover as tiras de acetato de celulose da cuba de eletroforese e colocá-las em vasilha contendo a solução corante Ponceau S. Deixar corando por 10 minutos. Evitar coloração por longo tempo, acima de 30 minutos.

8. Transferir as tiras para a vasilha que contém a solução descorante de ácido acético a 5%, agitando cuidadosamente por 3 a 5 minutos. Deixar em repouso por mais 5 minutos e trocar a solução descorante usada por outra limpa, até o tempo necessário para que as tiras de acetato de celulose se tornem claras e as frações de proteínas bem evidentes.

Quantificação por eluição

Para se proceder a eluição das diferentes frações de proteínas utilizam-se cinco tubos de ensaio. Para o tubo no qual será eluída a albumina se coloca 10ml da solução eluente, e para cada um dos quatro tubos restantes em que serão eluídas a alfa-1, alfa-2, beta e gama-globulina, se coloca 5ml do eluente. O "branco" se prepara com um pequeno pedaço da tira de acetato de celulose, escolhendo uma zona bem descorada. Os tubos devem ser agitados preferencialmente em "vortex" e quando as frações estiverem totalmente eluídas proceder a leitura de 415 nm, anotando o valor da densidade óptica (D.O.). O cálculo é realizado da seguinte forma:

Leituras da D.O. corrigida

Tubo de albumina	$D.O. \times 10 = D.O. \text{ corrigida}$
Tubo de alfa-1	$D.O. \times 5 = D.O. \text{ corrigida}$
Tubo de alfa-2	$D.O. \times 5 = D.O. \text{ corrigida}$
Tubo de beta	$D.O. \times 5 = D.O. \text{ corrigida}$
Tubo de gama	$D.O. \times 5 = D.O. \text{ corrigida}$
Soma do total = (Σ D.O. corrigida)	

Assim, a porcentagem de cada fração (F) é obtida de acordo com a seguinte fórmula:

$$\%F = \frac{\text{D.O. corrigido do tubo de}}{\Sigma \text{ D.O. corrigida}} \times 100$$

Obs.: Há certos tipos de acetatos de celulose que apresentam dificuldades de serem “digeridos” pela solução de ácido acético a 80%. Para esses casos, usam-se cinco tubos com 2ml de ácido acético puro (P.A.) para cada fração protéica. A leitura da D.O. é direta e o cálculo se faz por meio da somatória das cinco leituras da D.O. e aplicando-se a regra de três para saber o valor de cada fração.

Para obter o valor absoluto de cada fração protéica aplica-se uma regra de três simples. Por exemplo: o valor de proteínas totais foi de 7,00g/dL, e os valores percentuais das frações foram os seguintes:

Albumina	=	57,15%
Alfa-1	=	6,35%
Alfa-2	=	11,11%
Beta	=	15,87%
Gama	=	15,87%
Total	=	<u>100,00%</u>

O cálculo de cada fração será obtido da seguinte forma;

$$\frac{\% \text{ da fração} \times 7,00 \text{ g/dL}}{100}$$

Assim, os valores absolutos de cada fração serão os seguintes:

Albumina	=	4,00g/dL
Alfa-1	=	0,44g/dL
Alfa-2	=	0,78g/dL
Beta	=	0,67g/dL
Gama	=	<u>1,11g/dL</u>
Total	=	7,00g/dL

Quantificação por densitometria

A quantificação densitométrica pode ser efetuada por meio de equipamentos específicos – os densitômetros – ou utilizando o scanner do computador com software para quantificação de frações separadas eletroforeticamente. Geralmente os melhores resultados dessas avaliações são obtidos quando as tiras de acetato de celulose estão transparentizadas. A técnica de transparentização para as tiras de acetato de celulose é a seguinte:

- desidratar as tiras colocando-as num recipiente com metanol anidro, durante 30 segundos;
- transferir as tiras para a vasilha contendo a solução de transparentização, deixando-as por 60 segundos, no transcurso dos quais se agita o recipiente;
- retirar as tiras da solução anterior e colocá-las sobre uma placa de vidro, limpa, evitando a formação de bolhas. Colocar a placa de vidro em estufa a 60°C (por 15 a 20 minutos, ou até que se obtenha a transparentização completa), ou sob luz de raios infravermelhos até conseguir total transparência das tiras.

Tampão Optativo

O tampão optativo que apresentamos a seguir se deve às dificuldades em se obter o reagente do tampão veronal (dietil-barbiturato sódico).

Solução Tampão Tris-Glicina 0,025 M pH 9,5

Tris (hidroximetil) aminometano	14,1 g
Glicina	22,6 g
Água destilada q.s.p.	1000ml

Corantes Optativos

Sugerimos outros dois corantes, além do Ponceau S.

Para o corante negro de amido, quando utilizado na coloração e quantificação elutiva das proteínas séricas, deve-se usar o comprimento de onda de 415 nm ou 530 nm; o outro corante, o azul de bromofenol é sensível em 415 nm.

1. **Solução corante Negro de Amido**

Negro de amido	6 g
Metanol	450ml
Ácido acético glacial	100ml
Água destilada q.s.p.	1000ml

As tiras de acetato de celulose devem ser mergulhadas nessa solução corante por 10 minutos, e descoradas com solução de ácido acético a 5% após várias lavagens.

2. **Solução corante Azul de Bromofenol**

Azul de bromofenol	1 g
Metanol q.s.p.	1000 ml

As tiras de acetato de celulose devem ser mergulhadas nessa solução por 30 minutos, e descoradas com solução de ácido acético a 5% em três lavagens sucessivas de 6 minutos.

Eletroforese em gel de ágar (Agarose)

Princípios

O gel de ágar é um hidrocolóide que ao ser quimicamente tamponado a partir de concentração acima de 1% permite que o fracionamento das proteínas séricas ou plasmáticas se distribuem em zonas bem delimitadas. A qualidade do ágar e a densidade das fibras formadas pela polimerização das subunidades de galactose que compõem a base do ágar causam alto efeito eletroendosmótico. O controle da eletroforese em gel de ágar deve ser preferencialmente feito por meio da miliamperagem (mA), para evitar que o efeito termodinâmico, produzido pela intensa reação entre os íons do tampão e as fibras coloidais do ágar, determinam a dissolução do gel durante a eletroforese.

A eletroforese em gel de ágar apresenta melhor resolução de fracionamento que a obtida em acetato de celulose. Por ser originalmente transparente, o gel de ágar após ser seco, permite que após todos os procedimentos técnicos (fracionamento, coloração e descoloração) seja transparentizado para a leitura densitométrica.

Reagentes

1. Solução tampão tris-glicina 0,025 M, pH 9,5

Tris (hidroximetil) aminometano	14,1 g
Glicina	22,6 g
Água destilada q.s.p.	1000ml

Esta solução é usada nos compartimentos eletrolíticos e na composição do gel de ágar e agarose.

2. Solução corante: Ponceau S

3. **Solução descorante de ácido acético a 5%**

4. **Fixador para o ágar ou a agarose**

Glicerina	10ml
Ácido acético glacial	5ml
Isopropanol	85ml

Material

1. Aparelho de eletroforese
2. Lamínula
3. Lâminas de vidro para microscopia (2,5 x 7,5 cm)
4. Papel de filtro
5. Vasilhas para coloração e descoloração
6. Ionagar (para eletroforese em ágar)
7. Agarose
8. Erlenmayer de 100 ou 200ml
9. Proveta de 25ml
10. Fogareiro
11. Pipeta de vidro com capacidade para 10ml

Procedimento

1. Colocar no Erlenmayer 200mg de ionagar, ou de agarose*, e dissolvê-lo em 20ml do tampão tris-glicina, levando-o ao fogo e agitando rotatoriamente a cada 10 segundos, até completa dissolução do ágar. Pode ser usado microondas com tempo e intensidade previamente determinados.
2. Pipetar 3,5ml do gel liquefeito em cada lâmina. Esse procedimento deve ser realizado cuidadosamente: coloca-se a pipeta

verticalmente na porção média da lâmina e deixa-se que o gel se escoe lentamente por toda a extensão da lâmina, até completar o volume de 3,5ml. Esperar por 10 a 15 minutos para que o gel se solidifique.

3. Aplicar a amostra no gel, a 2cm da extremidade da lâmina que estará em contato com o compartimento do pólo negativo (cátodo). Para a aplicação, usa-se um pedaço de lamínula com 1,5cm de largura, molhado em sua porção inferior com a amostra a ser analisada. A aplicação faz-se introduzindo verticalmente o aplicador no gel – observando o cuidado de não atingir a lâmina. Pode ser usado também lâmina de aço para a aplicação.
4. Colocar as lâminas com ágar, ou agarose, na cuba de eletroforese e conectar suas extremidades com os compartimentos eletrolíticos por meio de “pontes” realizadas com duplo papel de filtro.
5. Passar 150 volts ou 40 miliamperes, no máximo por 30 minutos. O tempo exato deverá ser estabelecido após algumas corridas eletroforéticas.
6. Após concluído o processo eletroforético, retirar as lâminas cuidadosamente da cuba de eletroforese e mergulhá-las numa vasilha contendo fixador para o ágar ou a agarose. Fixar durante 20 a 30 minutos.
7. Retirar as lâminas do fixador e colocá-las para secagem do ágar ou da agarose. Esse processo se faz utilizando secador de cabelo (1 a 2 horas), ou estufa a 60°C, ou à temperatura ambiente (12 horas).
8. Após a completa secagem do ágar, ou da agarose, corar com Ponceau S por 10 minutos. As películas de ágar quase sempre se despregam da lâmina durante esse processo.
9. Transferir as lâminas para vasilhas contendo ácido acético a 5%, realizando duas a três lavagens por períodos de 15 minutos.
10. Após ter sido bem descoradas, as lâminas com ágar ou agarose são retiradas da vasilha com descorante e secadas ao ar por alguns minutos.

11. Avaliar quantitativamente as proteínas fracionadas por densitometria.

* Agarose type I: Low EEO, Sigma

Eletroforese em gel de poliacrilamida

Princípios

O gel de poliacrilamida tem uma complexa formação que inclui a polimerização da acrilamida e outros monômeros com auxílio de catalisadores químicos e físicos. A grande importância dada à eletroforese em gel de poliacrilamida é que as partículas submetidas ao seu fracionamento se separam por dois processos seletivos: carga elétrica e peso molecular. Essa dualidade de fracionamento pode ser variada conforme o tipo de proteínas que se pretende analisar, pois a porosidade do gel pode ser controlada para passagens de proteínas grandes, médias e pequenas.

A eletroforese em gel de poliacrilamida pode distinguir cerca de 30 componentes que fazem parte das proteínas séricas ou plasmáticas. Variando o tamanho dos seus poros é possível fracionar os vários tipos de pré-albumina, como também os diversos componentes de cada uma das quatro frações de globulinas (alfa-1, alfa-2, beta e gama).

Preparação da placa (Slab Gel)

A placa de vidro que será usada para acomodar o gel deve estar limpa, sem resíduo de qualquer natureza. Colocar, a seguir, os espaçadores untados com vaselina, nas duas laterais e na porção inferior. Cuidar para que a vedação entre as duas placas e os espaçadores seja

total. Após esta verificação colocar grampos de alta pressão, dois em cada lateral e dois na porção inferior da placa.

Preparação do gel de poliacrilamida

Reagentes	Concentração	
	10%	20%
Acrilamida a 30%	6,7ml	13,3ml
Bisacrilamida a 1%	0,67ml	1,4ml
Tris 1M pH 8,7	5,0ml	5,0ml
TEMED*	10,0ml	10,0ml
Persulfato de potássio a 10%	0,1ml	0,1ml
Água destilada	7,5ml	7,5ml

*N, N, N¹, N¹ – Tetrametiletilenodiamino

Preparação do gel de empilhamento

Água destilada	7,00ml
Acrilamida a 30%	3,34ml
Bisacrilamida a 1%	2,60ml
Tris 1M pH 6,8	2,50ml
TEMED	10,0ml
Persulfato de potássio a 10%	0,1ml

Tampão de Amostra

SDS*	100mg
Tris pH 6,8	0,4ml
Glicerol	0,5ml

Azul de bromofenol 0,5%	30 μ l
Água destilada	5ml
Beta-mercaptoetanol	10 μ l
*Duodecil sulfato de sódio	

Tampão dos compartimentos eletrolíticos

Tris	3g
Glicina	14g
Água destilada	500ml
SDS	1g

Distribuição das amostras

Diluir 20 μ l de soro em 0,1ml de tampão da amostra.

Procedimento

1. Logo após a preparação do gel de poliacrilamida, este deve ser introduzido cuidadosamente, por meio de uma seringa, no espaço entre as duas placas de vidro. A introdução deve ser lenta para que o gel cresça formando uma linha na horizontal. A adição do gel deve alcançar a marca onde posteriormente será introduzido o "pente" que formará os poços de aplicação da amostra. Para que ocorra a polimerização, adicionar certa quantidade de água destilada, por meio de seringa de tuberculina, suficiente para formar uma película de 3mm sobre a linha horizontal do gel. Esta camada evitará a entrada de oxigênio no gel. Deixar a placa assim preparada por 45 minutos em repouso, de preferência no escuro.

2. Após a polimerização, a água é retirada invertendo cuidadosamente a placa. Em seguida coloca-se o gel de empilhamento da mesma forma como foi feito para o gel de poliacrilamida. Encaixa-se o “pente” e deixa-se o conjunto placa – “pente” em repouso por 20 a 30 minutos. Quando o gel de empilhamento estiver polimerizado, se retira cuidadosamente o “pente” e lava-se os poços com água destilada. A seguir, coloca-se em cada poço a amostra diluída e o espaço restante do poço é preenchido com o tampão dos compartimentos eletrolíticos.
3. A placa é acomodada e fixada na cuba de eletroforese e os cabos conectados com a fonte geradora de voltagem. O processo eletroforético se desenvolve do pólo negativo para o positivo.
4. Passar 150 volts por 2 a 3 horas. O tempo exato deverá ser estabelecido após algumas corridas eletroforéticas.
5. Após o término da corrida eletroforética o gel é retirado cuidadosamente das placas e mergulhado na vasilha, contendo a solução corante (Ponceau , negro de amido ou azul de bromofenol). A descoloração é feita com ácido acético a 7%. Após a total descoloração o gel pode ser fotografado ou estocado na mesma solução descorante por longo tempo. A análise deve ser efetuada por pessoa experiente, pois o grande número de frações pode causar problemas na avaliação qualitativa das proteínas plasmáticas.

CAPÍTULO 16: LIPOPROTEÍNAS

Introdução

Os dois principais lipídeos no sangue são colesterol e triglicerídeos. Eles são hidrofóbicos, ou seja, repelem a água, e circulam no plasma ligados a **apoproteínas** em complexos químicos conhecidos por lipoproteínas. O colesterol é essencial para a formação das membranas celulares, na produção de **hormônios esteróides** e na formação de **ácidos biliares**. Os triglicerídeos são importantes na utilização de energia.

A elevação de colesterol, ou hipercolesterolemia, é o fator de maior risco para o desencadeamento de doenças arteriais coronarianas. A manutenção da concentração de colesterol em níveis aceitáveis de normalidade em pacientes com doenças cardiovasculares diminui a incidência de mortalidade neste grupo de doenças.

Lipoproteínas, por sua vez, são estruturas químicas compostas por diferentes quantidades de colesterol, triglicerídeos, proteínas e fosfolipídeos, conforme mostra a tabela 16.1. Estruturalmente as lipoproteínas tem um núcleo interno de triglicerídeos e ésteres de colesterol a cujo conjunto se convencionou denominar de lipídeos hidrofóbicos, e este núcleo é por sua vez envolvido por fosfolipídeos hidrofílicos e colesterol não-esterificados. As **apolipoproteínas** são encontradas na superfície desses complexos lipoprotéicos e tem a função de regular o metabolismo das lipoproteínas.

A classificação das lipoproteínas plasmáticas é feita de acordo com as suas densidades, o que reflete o conteúdo lipídico. Quanto maior o conteúdo de lipídeos, menor será a densidade e maior a tendência de flutuar no plasma submetido a ultracentrifugação a 26°C (taxa de flutuação, em soluções salinas, medida em unidades Svedberg = Sf).

TABELA 16.1 – Composição química e características físicas de diferentes tipos de lipoproteínas.

Tipos	Composição química				Características físicas			
	Proteínas %	Triglicerídeos %	Fosfolipídeos %	Colesterol %	Diâmetro A	Densidade g/ml	Taxa de flutuação	Posição da migração eletroforética
Quilomícrons	< 2	80-95	3 a 6	L = 1 – 3 E = 2 – 4	750 a 12000	0,92 a 0,96	Sf de 400 a 10 ⁵	Local de aplicação da amostra
VLDL	5 – 10	45 – 65	15 – 20	L = 4 – 8 E = 16 – 22	280 a 750	0,95 a 1,005	Sf de 20 a 400	Pré-beta
IDL	10 – 25	20 – 40	10 – 20	L = 10 – 15 E = 20 – 50	230 a 270	1,006 a 1,019	Sf de 12 a 20	Beta
LDL	15 – 30	5 – 10	15 – 25	L = 46 – 50 E = 18 – 22	190 a 220	1,019 a 1,063	Sf de 0 a 12	Beta
HDL	10 – 25	20 – 40	10 – 20	L = 10 – 15 E = 45 – 55	70 a 130	1,063 a 1,210	Fº 1,20 de 0 a 9	Alfa-1

Sf (taxa de flutuação corrigida em densidade 1,063)

Fº 1,20 (taxa de flutuação corrigida em densidade 1,20)

- a. **Quilomícrons** – São as maiores lipoproteínas e constituem gotículas quase puras de triglicerídeos, envolvidas por uma camada muito fina de proteína. Os quilomícrons transportam as gorduras e esteróis do intestino delgado, onde são absorvidas durante a digestão, até os depósitos de gorduras. Eles têm diâmetro de 750 a 12.000 Å, taxa de flutuação (Sf) de 400 a 10⁵ e densidade de 0,92 a 0,96 g/ml. A composição dos quilomícrons e algumas de suas características físicas são dadas na tabela 16.1. Eles são ricos em triglicerídeos e contêm geralmente menos de 2% de proteínas. As proteínas dos quilomícrons são encontradas na seguinte proporção:

- Apolipoproteínas A (apo A-I e apo A-II) 12%;
- Apolipoproteínas B 22%;
- Apolipoproteínas C (apo C-I , apo C-II e apo C-III) 66%.

Os quilomícrons sofrem a catabolização mais rápida de todas as lipoproteínas, sendo que nos seres humanos os seus triglicerídeos são removidos da circulação em menos de uma hora, em duas fases principais:

- Hidrólise em regiões tissulares periféricas pela ação da lipase lipoprotéica presente no endotélio capilar;
- Remoção pelo fígado, das partículas restantes (vestígios de quilomícrons ricos em colesterol ésteres).

- b. **Lipoproteínas de densidade muito baixa** (VLDL) – Os triglicerídeos sintetizados endogenamente entram na circulação vindos do fígado (principal órgão de síntese de VLDL) e intestino (fonte secundária). As lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL) se assemelham aos quilomícrons em quantidade de triglicerídeos e na densidade inferior a 1,006 g/ml, mas diferem dos mesmos em relação a composição protéica e com tamanho menor. Assim como os quilomícrons, a VLDL libera os seus triglicerídeos para o tecido

adiposo por uma interação com a lipase lipoprotéica na superfície endotelial.

A composição das VLDL depende do tamanho das partículas. A proporção dos triglicerídeos e das apo-C é maior nas partículas grandes, enquanto nas partículas menores as proporções de fosfolípidos e apo-B são maiores.

O destino da partícula residual formada no catabolismo da VLDL, através de seu principal componente protéico, a apoproteína B, é a lipoproteína de baixa densidade (LDL) encontrada no plasma.

- c. **Lipoproteínas de densidade intermediária (IDL)** – Atualmente, as lipoproteínas que eram confundidas com as LDL, constituem uma classe distinta que em ultracentrifugação analítica aparecem como uma região pequena, com pico diferente da LDL. A taxa de flutuação (Sf) varia de 12 a 20. Os lípidos correspondem a 85% do peso das IDL, e o colesterol é o componente lipídico mais abundante. Embora apresente pequenas quantidades de apo-C e apo-E, a principal proteína da IDL é a apo-B.

Ainda não se sabe se o processo de degradação das IDL ocorre no endotélio ou no fígado, mas os estudos metabólicos indicam que as lipoproteínas de densidade intermediária resultam do catabolismo de lipoproteínas ricas em triglicerídeos.

- d. **Lipoproteínas de baixa densidade (LDL)** – Embora se saiba que a LDL venha do catabolismo da VLDL, acredita-se que ela também possa ser sintetizada pelo fígado. Os lípidos que as LDL transportam, especialmente o colesterol, podem ser usados para a síntese da membrana plasmática. As

lipoproteínas de baixa densidade são removidas irreversivelmente pelos tecidos periféricos.

As LDL são menores que os quilomícrons e VLDL, mas a sua densidade é maior que a de ambas. As partículas de LDL são mais ricas em proteínas e mais pobres em triglicerídeos que os quilomícrons e VLDL.

- e. **Lipoproteínas de alta densidade (HDL)** – São as lipoproteínas que apresentam a maior proporção de proteínas, em peso (cerca de 50%) e a menor proporção de triglicerídeos (cerca de 3%). O seu diâmetro é o menor encontrado nas lipoproteínas, mas a sua densidade é a maior.

A composição lipídica das lipoproteínas de alta densidade (HDL) é formada por fosfolípidos (26 a 32%), colesterol livre (15 a 20%) e triglicerídeos (2 a 7%). As apolipoproteínas A (apo A-I e apo A-II) correspondem a cerca de 90% do total, em peso, das proteínas componentes de HDL. As proteínas C constituem cerca de 5% e as apolipoproteínas D e outras compreendem os 5% restantes. A HDL liberada pelo fígado contém apolipoproteínas A e C recém sintetizadas, enquanto o intestino parece produzir apolipoproteína A.

Possivelmente as HDL devem desempenhar um papel intermediário em conjunto com a enzima plasmática lecitina-colesterol aciltransferase (LCAT) na distribuição do colesterol para os tecidos.

Laboratorialmente, entretanto, é possível visualizar as lipoproteínas por meio de eletroforese de lipídios, também conhecida por lipidograma. Por essa metodologia a avaliação se faz pelo fracionamento das lipoproteínas séricas ou plasmáticas em três frações: alfa-lipo proteína, pré-beta lipoproteína e beta lipoproteína, conforme mostra a figura 16.1.

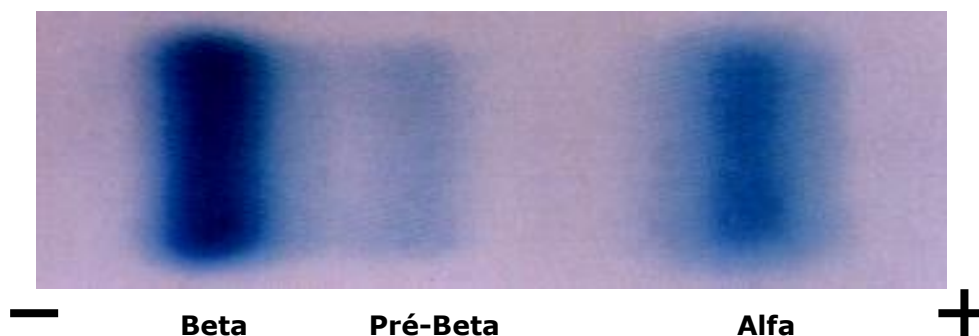


Figura 16.1 – Eletroforese de lipoproteínas em acetato de celulose.

Apolipoproteínas

Os componentes protéicos das lipoproteínas, as apolipoproteínas, são um grupo complexo de polipeptídeos que determinam o destino metabólico dos lipídeos do plasma e sua captação pelos tecidos. Atuam também como ativadores ou inibidores das enzimas envolvidas no metabolismo das lipoproteínas. Basicamente as apolipoproteínas foram diferenciadas em suas estruturas químicas e resultaram em quatro grandes grupos: A, B, C e D, e os grupos A e C apresentam subgrupos, conforme a apresentação que se segue abaixo.

a. Apolipoproteína A-I

Em todas as espécies estudadas até o momento, a apo A-I aparece como principal componente protéico das lipoproteínas de alta densidade (HDL). É uma cadeia polipeptídica única, com 245 resíduos de aminoácidos, que não apresenta cistina, cisteína e leucina. Em presença de apo A-II aumenta a sua capacidade de interagir e de ligar fosfolipídeos.

b. **Apolipoproteína A-II**

Ao lado da apo A-I, representa um dos principais componentes protéicos das HDL, com cerca de 30% das apolipoproteínas das HDL. É formada por duas cadeias polipeptídicas idênticas, com 77 resíduos de aminoácidos cada uma. De todas as espécies estudadas até o momento o homem e o chimpanzé apresentam a apo A-II, de constituição dimérica, em que as duas cadeias são ligadas na posição 6 por uma ponte bissulfídrica, enquanto que nos bovinos, cães, ratos, coelhos, babuínos a apo A-II é monomérica.

c. **Apolipoproteína B**

É o principal componente protéico dos quilomícrons e das lipoproteínas de densidade baixa (LDL), sendo que nestas últimas representa mais de 90% de suas proteínas. O número de subunidades desta proteína ainda não está totalmente caracterizado. Acredita-se que a apo-B desempenha importantes funções no transporte dos triglicerídeos do intestino e fígado para o plasma.

d. **Apolipoproteína C-I**

É a menor das apolipoproteínas já caracterizadas, correspondendo a cerca de 10% das apolipoproteínas das VLDL e 2% das HDL. A sua sequência de aminoácidos com uma única cadeia de 57 aminoácidos também é conhecida.

e. **Apolipoproteína C-II**

Representa uma pequena fração das apo HDL e 5 a 10% das apo VLDL. As análises das sequências de aminoácidos revelaram de 80 a 95 resíduos. Ela ativa a lipase lipoprotéica do tecido adiposo, mas não a hidrolase triglicéridica hepática.

f. **Apolipoproteína C-III**

É a mais frequente das apo-C, representando de 25 a 30% das apo VLDL e 2% das apo HDL. Apresenta uma única cadeia polipeptídica, com 79 resíduos de aminoácidos.

g. **Apolipoproteína D**

A apolipoproteína D corresponde cerca de 5% das apo HDL e pode ser encontrada em pequenas quantidades em outras lipoproteínas. A sua composição de aminoácidos ainda não está bem estabelecida. Algumas pesquisas mostram a ativação de LCAT pela apo-D.

h. **Apolipoproteína E**

Constitui de 6 a 12% das apo VLDL de indivíduos normais, podendo mostrar concentrações aumentadas em indivíduos com hipotireoidismo e hiperlipoproteinemia tipo 3. É muita rica em arginina.

Deficiência genética de lipoproteínas

a. **Abetalipoproteinemia**

Embora o defeito na abetalipoproteinemia não seja conhecido, o mais provável é uma falha na síntese de apolipoproteína B.

A abetalipoproteinemia pode provocar manifestações clínicas que incluem alterações gastrointestinais, de mucosa, deficiência na absorção intestinal de lipídeos, manifestações neuromusculares, anomalias esqueléticas e degenerações pigmentares retinianas. As manifestações hematológicas podem incluir a presença de acantócitos que representam de 50 a 70% das hemácias. A vida média das hemácias está geralmente diminuída. O aumento da renovação das hemácias nos pacientes com abetalipoproteinemia se reflete em um baixo nível de haptoglobinas ou sua ausência, reticulocitose e hiperbilirrubinemia. Em

crianças pequenas a abetalipoproteinemia pode causar anemia grave, com níveis de hemoglobina que podem chegar de 4 a 8 g/dL.

Nesta deficiência, ocorrem ainda duas alterações importantes:

1) As concentrações dos principais lipídeos estão reduzidas a menos da metade do normal. Os triglicerídeos se encontram, geralmente, abaixo dos níveis normais, o que acarreta a ausência de quilomícrons e VLDL.

2) Pelo fato de 70% do colesterol do plasma ser transportado pelas LDL, a ausência desta resulta em uma acentuada hipocolesterolemia e todo o colesterol plasmático está virtualmente ligado a HDL. Entretanto, as concentrações de HDL são muito variáveis, e alguns pacientes podem mostrar concentrações normais de colesterol.

A constatação ou não de lipoproteínas de baixa densidade ($d > 1,006 \text{ g/ml}$), pela ultracentrifugação, no plasma de indivíduos com abetalipoproteinemia depende do método utilizado. A ultracentrifugação analítica não revela lipoproteínas de baixa densidade e a eletroforese não demonstra lipoproteínas com mobilidade beta, mesmo após a adição de colesterol livre e fosfatidilcolina no plasma. O processo de ultracentrifugação preparativa de grandes quantidades de plasma tem permitido a recuperação de algumas lipoproteínas de baixa densidade, de indivíduos com abetalipoproteinemia. Não se sabe se estas partículas ricas em proteínas (cerca de 3%) e pobres em colesterol éster (cerca de 2%), correspondem a uma pequena fração de LDL. Sua mobilidade eletroforética é alfa.

O plasma de indivíduos portadores de abetalipoproteinemia não apresenta lipoproteínas de baixa densidade nem a sua apolipoproteína B livre. Estudos imunoquímicos, eletroforéticos e de análise de aminoácidos mostram que as apolipoproteínas A (apo A-I e A-II) são idênticas às suas correlatas. As apolipoproteínas C (apo C-I, C-II e C-III), isoladas dos pacientes com abetalipoproteinemia por cromatografia de troca iônica, produziram reações imunológicas idênticas às do apo C do plasma normal. Indivíduos abetalipoproteinêmicos

apresentam HDL enriquecida com apo C-II, o que é importante, pois a quantidade de apo C-II na HDL é normalmente bem menor do que a sua concentração relativa na fração de apolipoproteína C da VLDL.

A abetalipoproteinemia tem sido relatada em vários países, em caucasóides, negróides e mongolóides, com inquestionável natureza genética. Os dados disponíveis são consistentes com um padrão de herança autossômica recessiva.

Os achados em abetalipoproteinêmicos incluem degeneração da retina, alterações neuromusculares, má absorção, acantocitose, presença simultânea de concentrações muito baixas de colesterol (< 320 mg / 100ml). O diagnóstico depende de teste imunológico, usando o soro anti-LDL (antibetalipoproteína) para conformar a presença de apolipoproteína B no plasma.

b. Hipobetalipoproteinemia Hereditária

A hipobetalipoproteinemia familiar é uma alteração distinta da abetalipoproteinemia clássica. Três critérios diagnosticados têm sido levados em conta:

1. A lipoproteína de baixa densidade (LDL) está anormalmente baixa, porém presente e identificável por testes imunológicos, enquanto que as concentrações de lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL) e lipoproteínas de alta densidade (HDL) são normais.
2. Ausência de doenças secundárias.
3. Detecção de um padrão semelhante em um parente de primeiro grau.

Sabe-se que estes critérios são válidos apenas para indivíduos hipobetalipoproteinêmicos heterozigotos, pois vários casamentos entre tais indivíduos produziram prole supostamente homozigota para essa alteração, com manifestações clínicas que podem estar bastante atenuadas em relação à forma clássica de abetalipoproteinemia.

Os heterozigotos podem apresentar intolerância a comida gordurosa, mas não apresentam degeneração neuromuscular e retinite pigmentosa atípica, e os acantócitos no sangue periférico são raros. As concentrações de lipídios podem ser algumas vezes normais, mas geralmente mostram hipolipidemia leve a moderada. Os níveis de colesterol variam de 42 a 180 mg/dL, triglicerídeos de 15 a 125 mg/dL e fosfolipídeos plasmáticos de 74 a 190 mg/dL. As concentrações de HDL podem ser normais, altas ou baixas e as concentrações de VLDL correspondem a 25% do normal, quando utilizado o método de ultracentrifugação analítica, e de 10 a 60% pela ultracentrifugação preparativa ou de precipitação polianiónica.

Os indivíduos heterozigotos de hipobetalipoproteinemia diferem daqueles heterozigotos para abetalipoproteinemia por serem incapazes de manter concentrações normais de LDL, enquanto que os homozigotos para ambas as alterações são incapazes de elaborar VLDL e quilomícrons e não apresentam traços de LDL ou de apo B no plasma.

Algumas famílias hipobetalipoproteinêmicas têm sido relatadas e os dados são mais consistentes com um padrão de herança autossômica dominante.

As concentrações de colesterol plasmático abaixo de 100 mg/dL e de triglicerídeos abaixo de 50 mg/dL são suspeitas de hipobetalipoproteinemia. As concentrações de LDL são geralmente maiores que 50% da concentração média dos controles de mesmo sexo e idade.

c. **Deficiência Hereditária de HDL** (Doença de Tangier)

Apresenta como característica a deficiência acentuada ou ausência de lipoproteínas de alta densidade (HDL) no plasma, e acúmulo em órgãos como o fígado, baço, timo, linfonodos, mucosa intestinal, etc., de colesterol éster. A combinação de baixa concentração plasmática de colesterol, com níveis normais ou elevados de triglicerídeos, tecido adenóide e amídalas amarelo-alaranjadas hiperplásicas é característica da

doença de Tangier. Além de ocorrer em baixas concentrações, a HDL Tangier difere da HDL normal em relação à composição apolipoprotéica. A alteração parece ser condicionada por gene autossômico recessivo. A eletroforese de lipoproteínas mostra ausência da fração de mobilidade alfa. A doença pode ser devida a um defeito na regulação da síntese ou do catabolismo da HDL.

Hiperlipoproteinemias hereditárias

As hiperlipoproteinemias hereditárias foram descobertas, inicialmente, por uma de suas manifestações secundárias, a xantomatose (depósito de lipídeos na pele e tendões) e constituem um grupo de seis alterações que produzem aumento de colesterol do plasma ou da concentração de triglicerídeos. Acredita-se que cada uma dessas alterações tenha um mecanismo de herança monogênica. Contudo, a constatação de elevação do nível plasmático de lipídeos (hiperlipidemia) por si só não é suficiente para o diagnóstico de uma hiperlipoproteinemia (aumento da concentração de lipoproteínas) familiar.

As deficiências genéticas de lipase lipoprotéica, hipercolesterolemia e hiperlipoproteinemia tipo 3 são, geralmente, caracterizadas nas anomalias clínicas e bioquímicas, dispensando a quantificação dos níveis de lipídeos e lipoproteínas do plasma. Por outro lado, a hipertrigliceridemia, hiperlipidemia combinada e hiperlipoproteinemia tipo 5 não apresentam manifestações clínicas e características bioquímicas exclusivas. Para distinção de hiperlipidemia de etiologia multifatorial e para o diagnóstico de uma alteração monogênica, precisa ser demonstrado:

- a) que a hiperlipidemia em questão é de origem hereditária;
- b) que a segregação entre os parentes afetados seja consistente com um padrão mendeliano.

A combinação dos níveis do colesterol total do plasma, concentração de triglicerídeos e o aspecto do plasma após a incubação a 4°C, por 18 horas ou mais, para detectar uma camada de aspecto cremoso, indicativa da presença de quilomícrons, pode ser sugestiva de um dos seis principais padrões lipoprotéicos anormais.

Embora os padrões de lipoproteínas possam ser reduzidos pelos elementos indicativos da tabela 16.2, é útil a determinação do nível de colesterol - LDL, após isolamento da LDL do plasma total por ultracentrifugação, quando o nível da VLDL do plasma se mostra elevado. A eletroforese do plasma total não tem se mostrado de utilidade geral na determinação dos diferentes padrões de lipoproteínas, mas a ultracentrifugação do plasma total associada à eletroforese da fração de VLDL isolada, permite a identificação da VLDL (migração na região de beta lipoproteína), característica de indivíduos com padrão lipoprotéico tipo 3.

Tabela 16.2 – Tipos de alterações lipoprotéicas relacionadas com o aspecto do plasma e concentrações de colesterol e triglicerídeos.

Tipo	Alterações lipoprotéicas	Aspecto do plasma após 18 h ou mais a 4°C	Alterações nas concentrações de lipídeos
1	Quilomícrons presentes acentuadamente marcados	Camada superior cremosa e inferior clara	C e TG (↑)
	VLDL, LDL e HDL (N ou ↓)		
2a	LDL (↑)	Claro	C (↑) e TG (N)
	VLDL (N)		
2b	LDL (↑)	Claro ou ligeiramente turvo	C e TG (↑)
	VLDL (↑)		
3	VLDL (beta flutuante) presente	Geralmente turva, com leve camada cremosa	C e TG (↑)
4	VLDL (↑)	Geralmente turva, sem camada cremosa	C (N) e TG (↑)
	Quilomícrons ausentes		
	LDL (N)		
5	Quilomícrons presentes	Camada superior cremosa e camada inferior turva	C e TG (↑)
	VLDL (↑)		

(N) Normal, (↑) aumentada, (↓) diminuída.

C = colesterol, TG = triglicerídeos.

A figura 16.2 e a tabela 16.3 resumem as principais características dos cinco tipos de lipoproteinemias, cujos detalhes bioquímicos, eletroforéticos e genéticos são descritos a seguir:

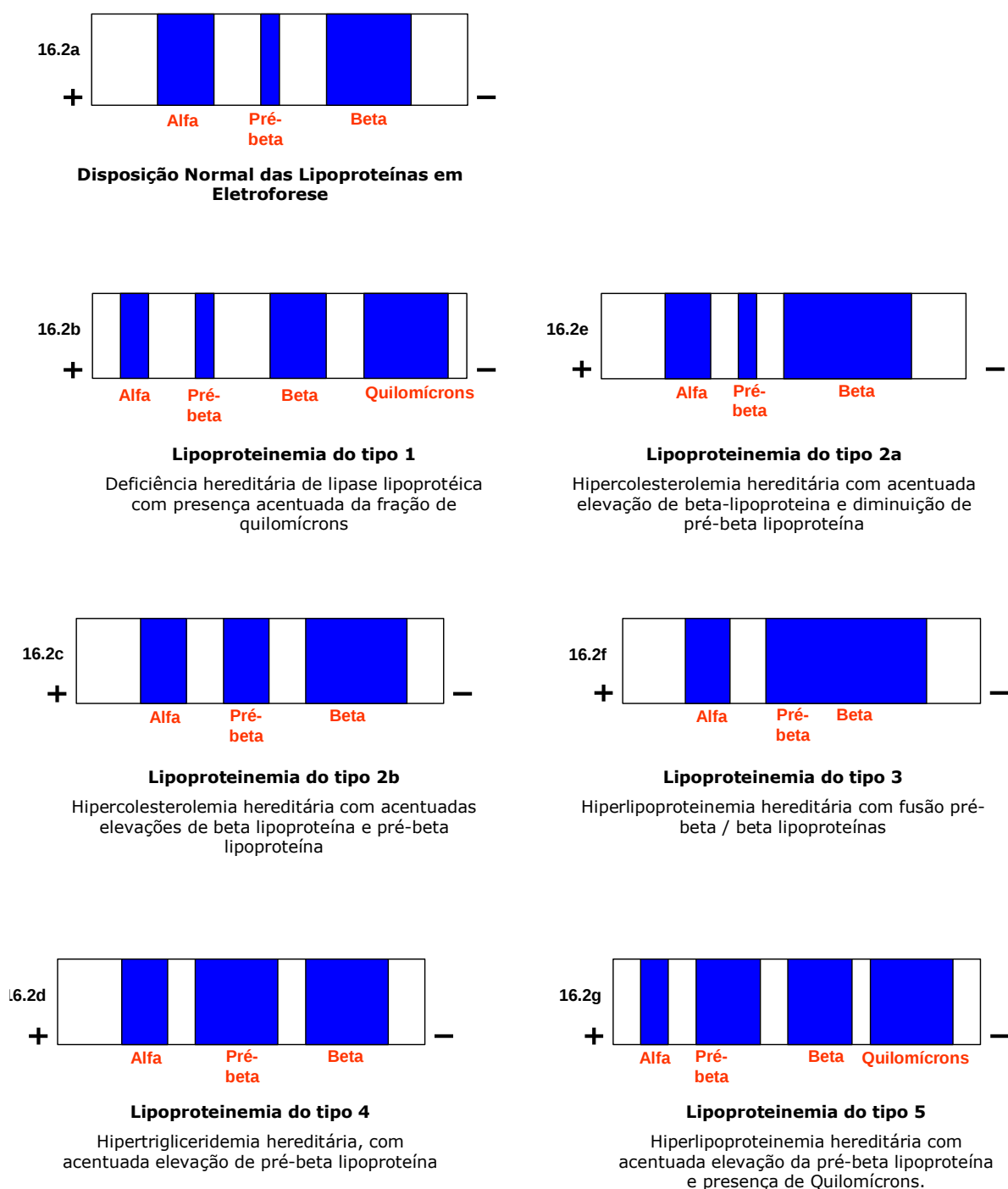


Figura 16.2 – Fracionamento eletroforético de lipoproteínas alfa, pré-beta e beta nas lipoproteinemias dos tipos 1, 2a, 2b, 3, 4 e 5 em comparação com a disposição normal das lipoproteínas.

Tabela 16.3 – Características dos diferentes tipos de hiperlipoproteinemias.

Hiperlipoproteinemia Tipo 1	
Origem	- Hiperlipidemia exógena devido à deficiência de lipase lipoprotéica
Definição	- Gordura hereditária induzida por hiperlicidemia
Idade	- Geralmente abaixo de 10 anos
Aspecto do plasma	- Cremoso
Colesterol sérico	- Normal ou discretamente aumentado
Triglicérides sérico	- Aumentado, acima de 2.000mg/dL
Eletroforese	- Figura 16.2 b
Quilomícron	- Aumento acentuado
Beta	- Normal ou diminuído
Pré-beta	- Normal ou diminuído
Alfa	- Diminuído
Outros dados	- Sangue com aspecto de "creme de tomate" - Lipemia retinal - Hepatoesplenomegalia - Xantomas - Dor abdominal
Relação triglicérides/colesterol:	8
Prevalência	- Raríssima

Hiperlipoproteinemia Tipo 2a	
Origem	- Indefinida
Definição	- Hiperbetalipoproteinemia (hipercolesterolemia)
Idade	- Ainda não está bem estabelecida
Aspecto do plasma	- Claro
Colesterol sérico	- Aumentado, entre 300 e 600mg/dL
Triglicérides sérico	- Normal
Eletroforese	- Figura 16.2e
Quilomícron	- Ausente
Beta	- Aumentado
Pré-beta	- Normal
Alfa	- Normal
Doenças principais	- Mixedema - Nefrose - Doença hepática obstrutiva - Stress - Porfíria - Anorexia nervosa - Hipercalcemia idiopática
Relação triglicérides/colesterol:	1
Prevalência	- Relativamente comum

Tabela 16.3 – Continuação.

Hiperlipoproteinemia Tipo 2b	
Origem	- Tolerância aumentada a lipídemia
Definição	- Hiperlipídemia combinada, ou mista
Idade	- Ainda não está bem estabelecida
Aspecto do plasma	- Claro para turvo
Colesterol sérico	- Aumentado, entre 300 a 600mg/dL
Triglicérides sérico	- Aumentado, maior ou igual a 400mg/dL
Eletroforese	- Figura 16.2c
Quilomícron	- Ausente
Beta	- Aumentado
Pré-beta	- Aumentado
Alfa	- Normal
Doenças principais	- As mesmas do tipo II-A
Relação triglicérides/colesterol:	variável
Prevalência	- Relativamente comum

Hiperlipoproteinemia Tipo 3	
Origem	- Indefinida
Definição	- Hiperglicerídemia carboidrato-induzida, com hipercolesterolemia
Idade	- Acima de 25 anos
Aspecto do plasma	- Claro, turvo ou leitoso
Colesterol sérico	- Aumentado, entre 300 a 1000mg/dL
Triglicérides sérico	- Aumentado, entre 200 e 1000mg/dL
Eletroforese	- Figura 16.2f
Quilomícron	- Ausente
Beta	- Aumentado (ligado à pré-beta)
Pré-beta	- Aumentado
Alfa	- Normal
Doenças principais	- Mixedema - Disgamaglobulinemia - Doença hepática
Relação triglicérides/colesterol:	2
Outros dados	- Hiperglicemia - Tolerância à glicose: anormal - Aumento do ácido úrico
Prevalência	- Raro

Tabela 16.3 – Continuação.

Hiperlipoproteinemia Tipo 4	
Origem	- Hiperlipidemia endógena
Definição	- Hiperglicidemia, carboidrato-induzida sem hipercolesterolemia
Idade	- Adultos e, ocasionalmente, em crianças
Aspecto do plasma	- Claro turvo e leitoso
Colesterol sérico	- Normal ou discretamente aumentado
Triglicérides sérico	- Aumentado, entre 500 e 1500mg/dL
Eletroforese	- Figura 16.2d
Quilomícron	- Ausente
Beta	- Normal
Pré-beta	- Aumentado
Alfa	- Normal
Doenças principais	- Síndrome nefrótica - Hipotireoidismo - Alteração no armazenamento de glicogênio
Relação triglicérides/colesterol:	1 a 5
Outros dados	- Ocorrência de hiperlipoproteinemia na gravidez - Ácido úrico aumentado - Tolerância à glicose: anormal
Prevalência	- Muito comum

Hiperlipoproteinemia Tipo 5	
Origem	- Hiperlipidemia mista, de causas endógenas e exógena (combinação dos tipos I e IV)
Definição	- Hipergliceridemia carboidrato-induzida
Idade	- Adultos jovens
Aspecto do plasma	- Muito turvo e cremoso
Colesterol sérico	- Aumentado, entre 250 e 500mg/dL
Triglicérides sérico	- Aumentado, 500 a 1500mg/dL
Eletroforese	- Figura 16.2g
Quilomícron	- Aumento acentuado
Beta	- Normal ou discretamente aumentado
Pré-beta	- Aumentado
Alfa	- Normal
Doenças principais	- Mieloma - Macroglobulinemia - Nefrose
Relação triglicérides/colesterol:	5
Outros dados	- Tolerância à glicose: anormal - Ácido úrico geralmente aumentado
Prevalência	- Rara

a. **Deficiência Hereditária de Lípase Lipoprotéica - Tipo 1**

A lipase lipoprotéica (LLP) dos portadores desta síndrome rara tem a sua atividade catalítica diminuída, acarretando deficiência na remoção extra-hepática de lipoproteínas ricas em triglicerídeos do sangue. Os indivíduos portadores desta alteração mostram padrão lipoprotéico tipo 1, com quilomicronemia maciça acompanhada de níveis diminuídos de outras lipoproteínas. A ocorrência de hiperlipoproteinemia tipo 1 é muito rara, provavelmente com frequência menor que um por um milhão.

Ao ingerir uma dieta sem restrições, o paciente com a deficiência hereditária de lipase lipoprotéica (LLP) mostra hiperlipoproteinemia tipo 1, que não é marcador específico de uma única doença genética.

A melhor forma de detecção da hiperlipoproteinemia é o aspecto do plasma após 18 horas ou mais a 4°C. Os quilomícrons correspondem a uma película branca superior e a camada logo abaixo mostra-se clara devido ao aumento não considerável da VLDL. As concentrações de LDL e HDL estão geralmente abaixo do normal. Os triglicerídeos estão bastante aumentados (2.500 a 12.000 mg/dL) e o colesterol não excede aos limites superiores da normalidade.

A deficiência hereditária da lipase lipoprotéica ocorre geralmente em ambos os sexos e em mais de um membro da família, em caucasóides, negróides e mongolóides, e os dados acumulados sugerem um padrão de herança autossômica recessiva.

b. **Hipercolesterolemia Hereditária – Tipo 2a e Tipo 2b.**

Apresentam elevação na concentração de colesterol plasmático, localizado na fração LDL (densidade 1,006 a 1,063 g/ml) e deposição de colesterol plasmático em alguns tecidos, como nos tendões (xantomas) e nas placas arteriais (ateromas). Os xantomas palpebrais (xantelasmas) podem ser comuns nos heterozigotos, mas são raros nos indivíduos homozigotos. Os xantomas aparecem nos heterozigotos em função da idade, demorando para se manifestar nos mesmos. No caso da

hipercolesterolemia hereditária, uma única mutação gênica produz tanto o aumento na concentração de colesterol como aterosclerose. No homozigoto a evidência clínica de doença cardíaca ocorre invariavelmente antes dos 30 anos e nos heterozigotos é muito variável.

Os resultados de estudos recentes mostram que a hipercolesterolemia familiar apresenta um padrão genético mendeliano autossômico dominante. Os indivíduos homozigotos são severamente afetados enquanto que os heterozigotos não.

Evidências recentes sugerem a ligação do gene da hipercolesterolemia hereditária com o gene do complemento C3 e que o mesmo parece não estar ligado aos "lócus" dos seguintes 13 marcadores genéticos: ABO, MN, Rh, Lutheran, Kidd, alfa-1 antitripsina, GM, Inv, haptoglobina, fosfoglicomutase, fosfatase ácida, transaminase do piruvato glutâmico e o antígeno betalipoproteína.

A determinação direta da prevalência de hipercolesterolemia, na população em geral ainda não é conhecida, mas as estimativas sugerem que, no mínimo, 1 em cada 500 indivíduos caucasóides são heterozigotos para essa alteração genética.

c. **Hiperlipoproteinemia Hereditária – Tipo 3**

Caracteriza-se por apresentar lipoproteínas de composição normal, cujas principais são as beta-VLDL que diferem da VLDL normal na porção apolipoprotéica, além de mostrar maior proporção de colesterol, quando comparada ao triglicerídeo. A hiperlipoproteinemia hereditária do tipo 3, na forma primária tem interesse clínico porque mostra depósitos lipídicos incomuns (amarelados) nas cristas palmares e a alta tendência para as doenças vasculares. É uma forma relativamente rara de hiperlipidemia.

A distinção desta alteração das outras formas de hiperlipidemia é feita classificando-se os pacientes pelos padrões lipoprotéicos. Os portadores de hiperlipoproteinemia familiar tipo 3 apresentam lipoproteínas na fração sobrenadante (densidade 1,006), com

mobilidade eletroforética beta. Em eletroforese, a beta-VLDL se separa da VLDL normal e mostra uma fração "beta-larga". Nem todos os indivíduos que apresentam a fração "beta-larga" na eletroforese do plasma têm beta flutuante, o principal marcador de hiperlipoproteinemia familiar tipo 3.

Esta alteração ainda aguarda testes definitivos para sua caracterização e de outros estudos para elucidação do seu padrão de herança.

d. **Hipertrigliceridemia Hereditária – Tipo 4**

É uma alteração pouco compreendida em que os heterozigotos apresentam elevação do nível de triglicerídeo plasmático, de origem endógena, ligado à VLDL. Embora seja considerada como autossômica dominante, estudos adicionais devem caracterizar o padrão de herança, assim como fornecer subsídios para a identificação da hipertrigliceridemia hereditária por métodos bioquímicos e características clínicas.

Algumas evidências indicam que a hipertrigliceridemia predispõe à doença coronária prematura, obesidade moderada, resistência a insulina, intolerância à glicose, etc.

A ingestão excessiva de álcool, ingestão de anticoncepcionais, dieta rica em carboidratos, desenvolvimento de hipotireoidismo ou *diabetes mellitus*, podem induzir os pacientes hipertrigliceridêmicos a exibir o padrão de lipoproteínas tipo 5, com nível de triglicerídeos plasmáticos acima de 1.000mg/dL e partículas com a característica de flutuação dos quilomícrons.

As observações têm mostrado que a expressão do gene é geralmente retardada nas crianças afetadas, até a idade de aproximadamente 20 anos.

e. **Hiperlipoproteinemia Hereditária – Tipo 5**

Alguns indivíduos, com o padrão de lipoproteína tipo 4, podem ser induzidos por fatores ambientais como alcoolismo, stress, ingestão muito alta de carboidratos, *diabetes mellitus* pouco controlada,

administração de estrógeno, etc., a expressar o padrão de lipoproteína tipo 5. Para se considerar um paciente com hiperlipoproteinemia tipo 5, ele deve expressar o padrão típico, mesmo na ausência de qualquer fator ambiental.

O padrão de herança desta alteração ainda não está completamente estabelecido.

f. **Hiperlipidemia Hereditária Combinada**

Não apresenta características clínicas bem estabelecidas, sendo a mais recente das hiperlipidemias familiares. Embora os dados disponíveis ainda sejam insuficientes, provavelmente os pacientes com hiperlipidemia hereditária combinada apresentem frequência aumentada de obesidade, intolerância a glicose, doença coronária, hiperinsulinemia, etc.

A análise genética dos dados mostram consistência com um padrão de herança autossômica dominante, embora os mesmos ainda sejam insuficientes para confirmação, porque o único método disponível para fazer o diagnóstico é encontrar vários membros afetados na mesma família.

A figura 16.3 mostra o resultado final de uma eletroforese de lipoproteína em acetato de celulose com três (1, 2 e 4) amostras de plasma alterados em comparação com dois padrões normais de fracionamento para lipoproteínas (3 e 5).

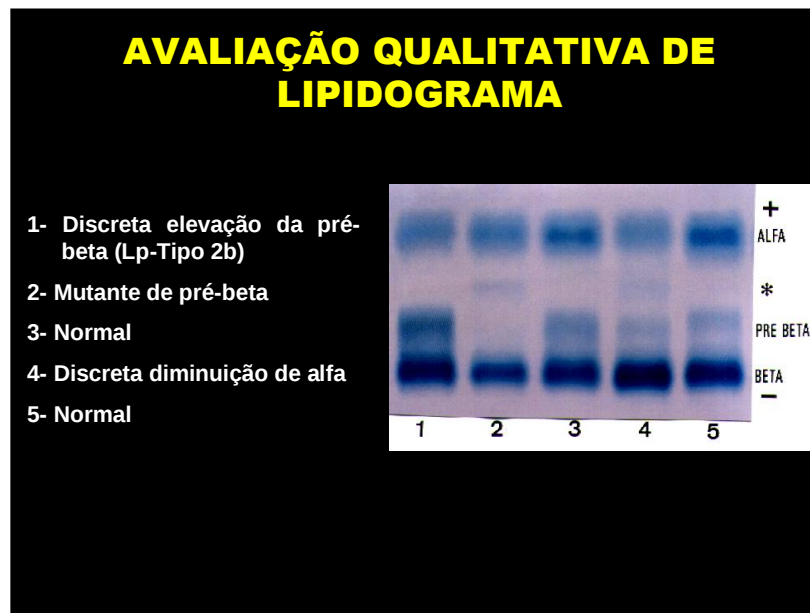


Figura 16.3: Eletroforese de lipoproteína em acetato de celulose. (1) discreta elevação de pré-beta lipoproteína; (2) mutante de pré-beta lipoproteína; (3) frações normais de lipoproteínas, (4) diminuição de alfa lipoproteína e (5) Frações normais de lipoproteínas.

Conclusão deste capítulo: Atualmente os médicos quase não solicitam o lipidograma que inclui a eletroforese de lipoproteínas. Há uma razão para esta atitude; quando foram publicados os primeiros resultados do fracionamento eletroforético das lipoproteínas, inclusive com a classificação de Friedrichsen (as Hiperlipoproteinemias dos tipos 1, 2, 3, 4 e 5), muitos laboratórios clínicos que adotaram a técnica eletroforética não conseguiram executá-las com sensibilidade e reprodutibilidade. Assim, os médicos começaram a desistir em pedir o lipidograma. Foi essa uma das causas que originou o estudo do fracionamento físico das lipoproteínas diferenciando-as por sua densidade e, assim, surgiram a HDL, VLDL e LDL colesterol, que foram adaptadas para serem dosadas bioquimicamente.

CAPÍTULO 17: TÉCNICAS LABORATORIAIS PARA A ELETROFORESE DE LIPOPROTEÍNAS

Introdução

Todas as frações lipídicas do plasma ou soro (fosfolípedes, colesterol e triglicerídeos) são transportadas pelo sangue combinadas com proteínas séricas conhecidas por lipoproteínas. Através da eletroforese é possível separar quatro bandas principais de lipoproteínas: quilomícrons, beta, pré-beta e alfa. Os quilomícrons são grandes partículas de gordura (glicerídeos agrupados) que possuem um diâmetro de 100 a 1000m μ . Numa pessoa normal, em jejum, o transporte de colesterol está principalmente a cargo das lipoproteínas beta; o transporte dos glicerídeos ocorre por meio das lipoproteínas pré-beta. Os ácidos graxos livres circulam unidos com albumina, porém esta não é considerada uma lipoproteína. No sangue do cordão umbilical as concentrações de lipoproteínas são baixas. Como os lipoproteinogramas oferecem informações complementares para as análises químicas dos lipídeos séricos, em geral se faz ambos os métodos ao mesmo tempo. Uma vez que todas as anormalidades dos lipídeos séricos produzem lipoproteinogramas séricos anormais, e tendo estabelecido correlações entre lipoproteinograma mais ou menos específicos com a cardiopatia coronária no ser humano, a técnica de eletroforese resultou em uma análise auxiliar para reconhecer casos potenciais ou reais de grave vasculopatia aterosclerótica (hereditária e adquirida).

A figura 16.2 apresentada no capítulo 16 mostra os diferentes traçados densitométricos nas lipoproteinemias dos tipos 1, 2a, 2b, 3, 4 e 5.

Obtenção da amostra

O sangue é coletado sem anticoagulante, por via endovenosa, exigindo jejum de 12-24 horas. Separa-se 1ml de soro sem hemólise, refrigerando-o entre 1 e 6°C. Deve-se evitar o congelamento do soro pois pode ocorrer a degradação das lipoproteínas séricas, em especial se sua concentração estiver aumentada.

Algumas observações se fazem necessárias:

- a. para se estabelecer um nível basal que sirva de referência para o tratamento, o paciente deve manter sua dieta usual (inclusive o consumo de álcool).
- b. a coleta de sangue em pacientes que receberam administração de meio radiopaco intravenoso (lipiodol) deve se processar pelo menos uma semana após, pois produzem grandes alterações nos lipidogramas.
- c. em mulheres estéreis, grávidas e aquelas que consomem anticoncepcionais, os valores de lipidogramas apresentam-se alterados.

Eletroforese em gel de ágar

Reagentes

1. Solução tampão veronal-Tris 0,05 M pH 8,8

5,5 ácido dietilbarbitúrico, sal sódico	10,30 g
5,5 ácido dietilbarbitúrico	1,84 g
Tris (hidroximetil) aminometano	7,20 g
Água destilada q.s.p.	1000ml

2. Solução corante:

Corante Sudan Black	1,0 g
Metanol	300ml

Isopropanol	300ml
Água destilada q.s.p.	1000ml

O Sudan Black é muito difícil para ser dissolvido e, por essa razão, sugerimos o uso de liquidificador para fazer a mistura deste corante. Filtrar através de 5 a 6 folhas de papel toalha poroso. No momento de uso, retirar 50ml da solução corante e adicionar 0,1ml de NaOH a 25%. Após 1 ou 2 dias, o corante diminui suas propriedades de fixação, devendo ser dispensado.

Preparação do Gel

Em um erlenmayer de 100ml, dissolver 400mg de Ionagar em 40ml do tampão tris-veronal pH 8,8. Esquentar a solução agitando-a rotatoriamente a cada 30 segundos, até a completa dissolução do Ionagar. Esta solução pode ser distribuída em lâminas de microscopia ($\pm$ 3,5ml por lâmina) ou em placas de vidro.

As macroeletroforeses em placas de vidro 20 x 20 cm necessitam de volume maior de solução ($\pm$ 500ml).

Aplicação da amostra (soro)

Após o gel ter se solidificado, faz-se orifícios para depositar os soros a serem analisados, utilizando a sucção de uma simples pipeta Pasteur. Outra forma de aplicar amostras se faz com a incisão do gel por meio de lamínula ou lâmina de barbear com 0,5 cm de extensão molhada com o material a ser analisado.

A aplicação da amostra deve estar distante a 2 cm da extremidade da placa que estará em contato com o pólo negativo da cuba eletroforética.

Eletroforese

Os compartimentos eletroforéticos devem ser preenchidos com tampão tris-veronal 0,05M pH 8,8, até que os eletrodos fiquem integralmente encobertos. No caso da impossibilidade de usar o tampão tris-veronal a opção é o tampão tris-glicina pH 8,5 a 9,0, apresentado neste capítulo.

O contato entre o gel de ágar e a solução tampão dos compartimentos eletrolíticos deve ser realizado com papel de filtro consistente.

Passar 150 a 200 volts durante 70 a 90 minutos.

Quando as concentrações de lipídeos estão muito elevadas, deve-se diluir os soros, nas proporções de 1:1 ou 1:2, com solução fisiológica.

Coloração

Após o procedimento eletroforético o gel é fixado com ácido acético a 5% durante 4 a 6 horas, tempo suficiente para que se processe também a eliminação dos sais do tampão aderidos ao gel.

A coloração com Sudan Black se faz por 3 horas e a descoloração com várias lavagens de isopropanol a 50%. Se ocorrer precipitação do corante no gel de ágar, recomenda-se o uso de papel de filtro sobre a superfície do gel antes de se adicionar o corante.

Eletroforese em acetato de celulose

A eletroforese em acetato de celulose é a mais viável e econômica para o uso em laboratórios clínicos. A facilidade de manuseio associada à rapidez com que se processa a corrida eletroforética permite

bons resultados. Atualmente a avaliação qualitativa tem sido muito utilizada por profissionais experientes, pois permite distinguir os tipos de lipoproteínemias. Por outro lado, a quantificação das lipoproteínas fracionadas no acetato de celulose pode ser efetuada por eluição em ácido acético puro (PA), ou por densitometria.

Eletroforese em agarose (kits comerciais)

Algumas empresas especializadas em comercializar produtos para laboratórios oferecem kits para eletroforese em agarose de lipoproteínas. Os resultados obtidos são excelentes (Figura 16.3) e com a vantagem de serem quantificados por densitometria cuja reprodução gráfica é muito elucidativa.

Reagentes para eletroforeses em acetato e agarose

1. Solução Tampão Tris-Glicina 0,25M pH 9,5

Tris-hidroximetil-aminometano	14,1 g
Glicina	22,6 g
NaCl	2,0 g
Água destilada q.s.p.	1000ml

2. Solução corante de Sudan Black (solução estoque)

Corante Sudan Black	400,0 mg
Etanol 96%	300ml

Deixar no homogeneizador magnético por 12 horas, ou dissolver por agitação em liquidificador.

3. Solução de NaOH a 5% (complemento da solução estoque)

Eletroforese em acetato de celulose

- Embeber as fitas de acetato de celulose no tampão tris-glicina pH 9,5 por 15 a 30 minutos.
- Retirar o excesso do tampão da superfície da membrana do acetato, colocando as fitas entre duas folhas de papel absorvente.
- Colocar as fitas na cuba de eletroforese com seus compartimentos eletrolíticos previamente preenchidos com o mesmo tampão tris-glicina.
- Aplicar o soro a 2 cm da extremidade da fita que entrará com o pólo negativo. Deixar que o soro aplicado seja absorvido e aplicar outra quantidade similar sobre a primeira aplicação.
- Passar 200 volts por 15 a 20 minutos.

Eletroforese em agarose

- Preparar a placa de agarose, retirando-a do envelope.
- Aplicar as amostras de soro (ou plasma) na cavidade do gel de agarose, preenchendo-as sem excesso. Deixar em repouso por 2 a 3 minutos para a perfeita penetração das amostras no gel de agarose.
- Colocar a placa de agarose na cuba eletroforética, certificando a polaridade dos eletrodos. A eletroforese se desenvolverá do pólo negativo em direção ao positivo.
- Passar 200 volts por 40 a 50 minutos.

Coloração das frações lipoprotéicas separadas no acetato de celulose e agarose

- Misturar 10 ml da solução estoque do corante Sudan Black com 5 ml de solução de NaOH a 5% minutos antes de finalizar a eletroforese. Para a eletroforese em agarose o volume de cada solução acima deverá ser triplicado.

- Embeber completamente o acetato de celulose ou gel de agarose por 2 a 6 horas. Descorar com água destilada.

Quantificação das frações de lipoproteínas

- Por eluição do acetato de celulose: as frações das lipoproteínas alfa, pré-beta, beta e quilomícrons (quando presente) são recortadas com tesoura e eluídas em tubos contendo 2ml de ácido acético puros, adequadamente identificados com relação às frações. Agitar vigorosamente os tubos até completa dissolução do acetato. Ler as densidades ópticas (D.O.) em 410nm usando um tubo com o diluente como branco. Calcular os valores específicos em relação à soma de todas as frações por meio de regra de três simples.
- Por densitometria: usada especialmente para o gel de agarose.

Interpretação qualitativa

Em geral são identificadas quatro frações lipoprotéicas principais:

1. **Quilomícrons:** principalmente triglicerídeos. Permanecem no ponto de origem. Normalmente não são visualizados no soro de pessoas que estiveram em jejum.
2. **Lipoproteína beta:** existe no soro normal. A maior parte do colesterol sérico está relacionada com esta fração.
3. **Lipoproteína pré-beta:** consiste principalmente de triglicerídeos endógenos. Apresenta-se corada com fraca intensidade. Nos soros anormais, com triglicerídeos elevados, a fração pré-beta está muito corada.

4. **Lipoproteína alfa-1:** está normalmente na zona da globulina alfa-1, quando se compara com a eletroforese de proteínas séricas.

Não há necessidade de quantificar as frações de lipoproteínas, pois os dados quantitativos poderão ser obtidos da determinação do colesterol e dos triglicerídeos séricos ou plasmáticos. A interpretação qualitativa dos traçados eletroforéticos (fenótipos de Fredrickson) se fará juntamente com os valores que se determinam do colesterol e triglicerídeos (Tabela 16.2).

Entretanto, na ausência dos valores das dosagens de colesterol e triglicerídeos, apresentamos as concentrações das frações alfa, pré-beta e beta.

Alfa: 20 – 35%

Pré-beta: 10 – 25%

Beta: 45 – 65%

CAPÍTULO 18: UMA BREVE HISTÓRIA DA MOLÉCULA DO DNA

Co- autores: Elisete Marcia Corrêa

Patrícia Abrão Possik

A história

A molécula de DNA (ácido desoxirribonucléico) é atualmente o elemento central das pesquisas de engenharia genética. Foi descoberta no final do século 19 e apesar da sua função na hereditariedade e no controle da atividade celular, só foi reconhecida pela maioria dos cientistas como a molécula capaz de armazenar e transmitir a informação genética após a publicação de sua estrutura tridimensional em 1953, por **James Dewey Watson** e **Francis Harry Compton Crick**. (Nota: o trabalho original de Watson e Crick está disponível em <http://www.nature.com/nature/dna50/watsoncrick.pdf>).

A história dessa fascinante molécula começou em 1868 com Friedrich Miescher que foi o primeiro a isolar uma substância química presente no núcleo de células provenientes do pus das bandagens de ferimentos. Essa substância de natureza ácida era rica em fósforo e nitrogênio e foi denominada nucleína e posteriormente ácido nucléico.

Lentamente a composição química do DNA foi sendo desvendada. Em 1894 Albrecht Kossel e Albert Neumann identificaram a presença de bases nitrogenadas na nucleína. Hoje se sabe que o DNA é composto pelas bases nitrogenadas purinas (adenina e guanina) e pirimidinas (timina e citosina) (Figura 18.1). Enquanto as adeninas (A) pareiam com as timinas (T) através da formação de duas ligações de hidrogênio, as guaninas (G) pareiam com as citosinas (C) formando três ligações de hidrogênio. Tais ligações entre as purinas e pirimidinas de fitas opostas formam o **pareamento de bases complementares** ao longo da fita de DNA. É na sequência de bases nitrogenadas do DNA que a informação genética reside. É importante mencionar que a molécula pode

armazenar informações em qualquer das duas fitas complementares, a fita denominada sense ou a antisense, alternando as fitas dependendo da informação a ser lida ou do gene a ser expresso.

A

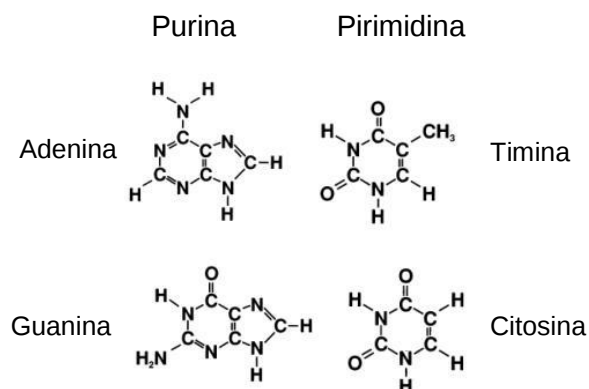


Figura 18.1: (A) Bases nitrogenadas que compõem os ácidos nucleicos. Observe que as bases purinas exibem 1 anel duplo enquanto que as pirimidinas somente 1 anel simples.

As bases nitrogenadas estão ligadas ao carbono 1' (lê-se um linha) da pentose. A designação "linha" é usada para distinguir os átomos de carbono que pertencem a ose, dos átomos de carbono da base nitrogenada. A pentose (que contém 5 átomos de carbono) presente no DNA é uma desoxirribose e foi descrita por Phoebus Aaron Levene em 1929. Por convenção o prefixo *desoxi* indica que esta ose não apresenta átomo de oxigênio no carbono 2'. Por outro lado, o RNA (ácido ribonucleico) difere do DNA por apresentar uma ribose na qual a ausência do prefixo *desoxi* indica a presença do átomo de oxigênio no carbono 2'(Figura 18.2).



Figura 18.2: Fórmula estrutural da ribose e da desoxirribose.

Levene foi um brilhante cientista. Estabeleceu a diferença química entre o DNA e o RNA e publicou vários artigos originais sobre as estruturas químicas de muitas biomoléculas. Sua crença de que o DNA era uma molécula simples, relativamente pequena e que sempre continha quantidades iguais dos quatro nucleotídeos o levou a formular a **Teoria do Tetranucleotídeo**. Essa teoria, totalmente incorreta, continha a hipótese que o DNA, ao contrário das proteínas, constituía-se de uma molécula sem complexidade suficiente para armazenar a informação genética. Em 1938 Levene descobriu que o DNA era um polímero de nucleotídeos e, portanto, muito maior do que ele havia imaginado.

O nucleotídeo é a unidade básica da molécula de DNA e é constituído pela base nitrogenada ligada ao carbono 1 da pentose que por sua vez possui pelo menos 1 grupamento ácido fosfórico ligado no carbono 5'. Em pH fisiológico, o ácido fosfórico encontra-se dissociado e por isso a carga resultante do DNA é negativa e seu caráter é ácido.

Cada nucleotídeo está covalentemente ligado ao outro através de uma **ligação fosfodiéster** 5'- 3'. A ligação fosfodiéster foi descrita por Alexander Robertus Todd no início da década de 50 e recebeu esse nome porque "fosfo" indica a presença de um átomo de fósforo e "diéster" refere-se às duas ligações éster (C-O-P), uma entre o fosfato e o carbono 5' de uma desoxirribose e a outra entre o fosfato e o carbono 3' da desoxirribose subsequente (Figura 18.3). Devido à natureza desta ligação, as duas extremidades de um filamento polinucleotídeo são

distintas. Em uma encontra-se o grupo fosfato 5' livre (extremidade 5') e na outra o grupo OH 3' livre (extremidade 3'). Como as duas fitas de DNA possuem sentidos inversos, isto é, o final 5' de uma cadeia é oposta ao final 3' da outra, diz-se que elas são **antiparalelas**.

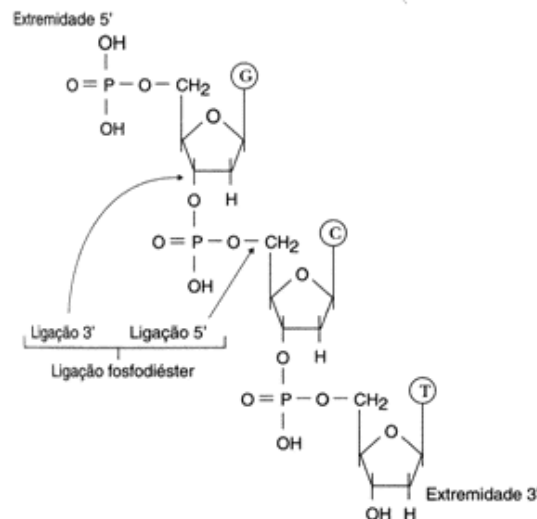


Figura 18.3: Estrutura de um polinucleotídeo. Observe a ligação fosfodiéster 5'- 3'. Fonte: Kreuzer, H. e Massey, A. (2002).

Por convenção a sequência de bases do DNA é sempre escrita na direção 5'-3', isto é, a extremidade 5' é mostrada à esquerda e a 3' à direita.

À medida que o tempo passava o conhecimento sobre a composição química do DNA se ampliava e Erwin Chargaff relatou que, para as diferentes espécies analisadas, a proporção de bases nitrogenadas adenina era igual a de timina e de citosina era igual a de guanina. Essa proporcionalidade ficou conhecida como **regra de Chargaff**.

Willian Astbury foi o primeiro pesquisador em 1939 a usar a análise de difração de raios X para visualizar a molécula de DNA. Astbury determinou que os nucleotídeos estavam posicionados em intervalos de 3,4 Å (1 Ångstrom = 10^{-10} metros) e depois dele essa técnica passou a ser amplamente empregada para o estudo da estrutura de várias proteínas.

Em 1950, Maurice Wilkins realizava os primeiros experimentos de difração com fibras de DNA e posteriormente Rosalind Elsie Franklin trabalhando na mesma instituição de Wilkins, mas de forma independente fotografou resultados provenientes da difração de raio X que demonstraram que o DNA é uma hélice. Suas pesquisas também indicaram que existiam duas formas cristalinas de DNA, a forma A (**DNA-A**) e a forma B (**DNA-B**) que diferiam por causa do grau de hidratação (Figura 18.4). O DNA-B, a forma mais hidratada encontrada nas condições fisiológicas, é a descrita por Watson e Crick.

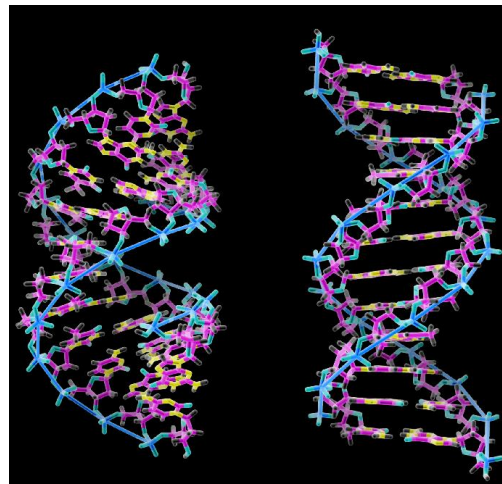


Figura 18.4: Diferentes formas cristalinas do DNA. Da esquerda para a direita DNA-A e DNA-B. Figura modificada de <http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/b/b1/A-DNA, B-DNA and Z-DNA.png>. Acesso em 18/09/2009.

Em 1951 Watson conheceu Crick e ambos interessados no DNA começaram a utilizar modelos tridimensionais para elucidar a estrutura da referida molécula. No entanto, Watson reunia informações experimentais sobre o DNA de forma pouco criteriosa e isso aumentava as dificuldades para a resolução da estrutura.

Em paralelo a esses acontecimentos pipocavam resultados experimentais que reforçavam os argumentos que as proteínas não eram responsáveis pelo armazenamento da informação genética.

Em 1944 Oswald Avery, Collin McLeod e Maclyn McCarty realizaram um experimento brilhante que demonstrava que a natureza química do agente transformante, capaz de transmitir a informação genética, e observado por Frederick Griffith em 1928, era o DNA. Em 1952, surgiram mais evidências de que o DNA era o material genético de bacteriófagos (um tipo de vírus), através do clássico “experimento do liquidificador” de Alfred Hershey e Martha Chase. No entanto, a comunidade científica recebeu essas evidências com certo ceticismo, pois ainda apostava nas proteínas para a função de material genético. Muitos ainda acreditavam que a complexidade protéica, com seus 20 aminoácidos dispostos em diferentes combinações, respondia pela prevista alta capacidade de armazenamento de informação genética. Por outro lado, a composição de apenas quatro nucleotídeos do DNA não apresentaria complexidade suficiente. Obviamente não se imaginava na época que um *design* simplista teria a importância que tem.

À medida que o tempo passava, a pressão aumentava, e até Linus Pauling não dispondo de bons resultados experimentais arriscou sugerindo que o DNA seria formado por uma tripla hélice, na qual o eixo de açúcar-fosfato se encontrava no interior da molécula e as bases nitrogenadas dispostas na parte externa.

Infelizmente (ou felizmente para Watson e Crick) Rosalind e Wilkins não se entendiam e o mal estar entre eles não permitiu que ocorressem as discussões necessárias para a compreensão da estrutura do DNA. Rosalind acabou deixando o *King's College* e iniciou trabalhos sobre a estrutura de vírus, falecendo pouco depois aos 35 anos.

Watson e Crick, após breve interrupção, reiniciaram as longas discussões teóricas sobre o tema e tiveram acesso aos dados da difração de raio-X da DNA-B obtidos por Rosalind que permitiram inferir que o DNA é uma molécula helicoidal de duas cadeias, com o esqueleto fosfato-desoxirribose na parte externa. Watson e Crick tiveram ainda o acesso ao relatório da Rosalind. Esse relatório revelava que a altura de uma volta completa da hélice é de 34 Å (que corresponde a cerca de **10 pares de**

base, portanto a distância entre dois pares de bases adjacentes é de 3,4 Å, uma largura (diâmetro) de 20 Å, e a informação de que a dupla hélice possui um giro para a direita (Figura 18.5). A relação espacial entre as desoxirriboses e as bases nitrogenadas geram uma superfície irregular formando dois sulcos (cavidades). O sulco maior, ou principal (que é mais largo) e o sulco menor, ou secundário. Essa característica é importante porque permite a interação do DNA com as proteínas.

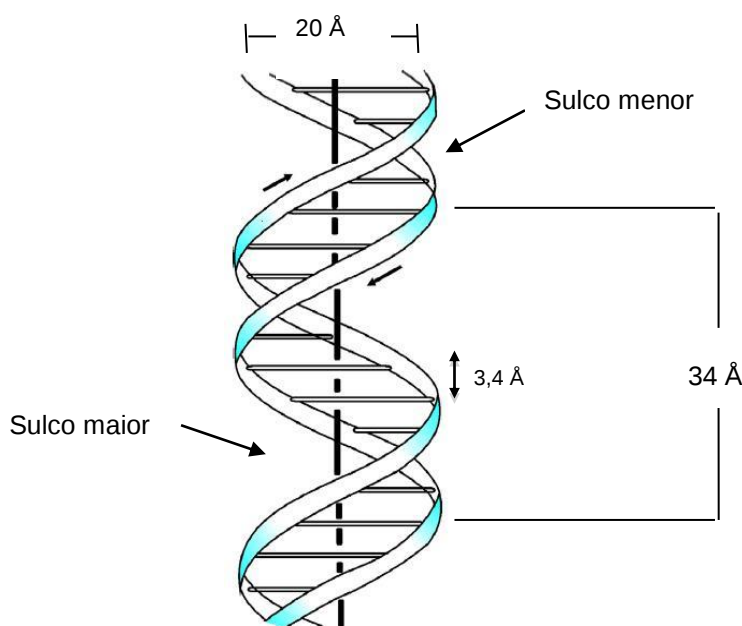


Figura 18.5: Representação da estrutura da dupla hélice. Esquema modificado de Moreira (2003).

A única peça que faltava no quebra-cabeça era entender como as bases nitrogenadas interagem e Jerry Donohue partilhou seu amplo conhecimento em química sugerindo que as bases nitrogenadas timina e guanina deveriam estar na forma tautomérica ceto em vez da enol (Figura 18.6).

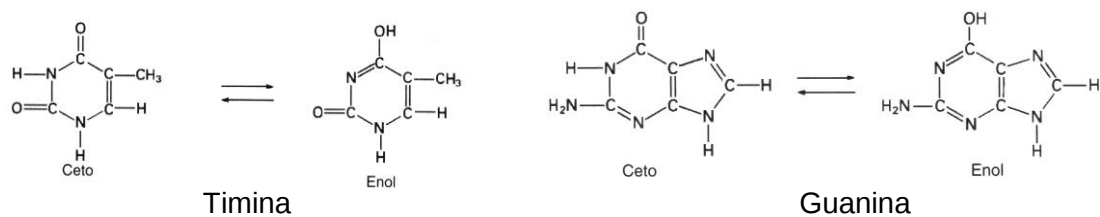


Figura 18.6: Formas ceto e formas enol da timina e da guanina.

De volta aos modelos de construção, Watson em 1953, percebeu que cada um dos pares: timina e adenina e citosina e guanina tinham conformação espaciais compatíveis em decorrência dos requerimentos de ligação do hidrogênio (Figura 18.7). Este pareamento permitia que as bases nitrogenadas se encaixassem dentro da dupla-hélice e era consistente com o diâmetro de 20 Å, mas implicava que as fitas deveriam ser antiparalelas, ou seja, a extremidade 5' de uma fita estaria orientada para o lado oposto da extremidade 5' da fita complementar. Consequentemente, cada fita conteria sequências de bases complementares as sequências da fita parceira.

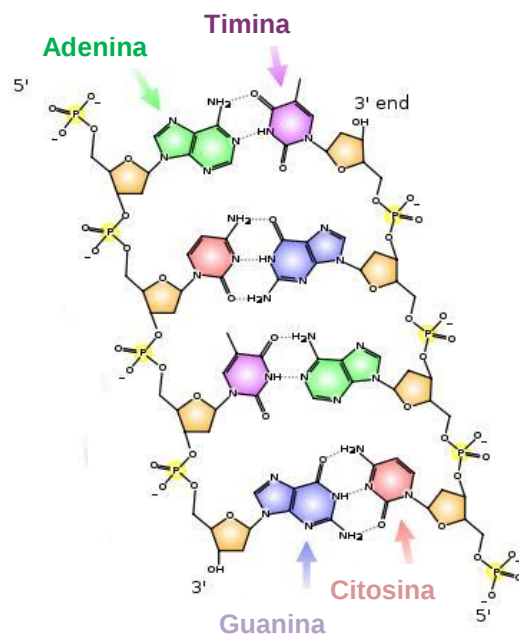


Figura 18.7: Padrões das ligações de hidrogênio nos pares de bases determinados por Watson e Crick, isto é, adenina (purina) com timina (pirimidina), e guanina (purina) com citosina (pirimidina). Figura modificada de:

<http://www.statemaster.com/encyclopedia/Francis-Crick> acesso 26/09/2009.

Em 25 de abril de 1953 Watson e Crick publicaram a estrutura do DNA e em 1962 partilharam o Prêmio Nobel com Wilkins. Após a publicação da descoberta da dupla hélice Watson e Crick se separaram. Watson trabalhou na síntese de RNA e proteínas, e motivou a execução do Projeto Genoma Humano. Crick deu várias contribuições importantes na área da biologia molecular tais como: a formulação do dogma central da biologia molecular e a hipótese do adaptador para mediação da síntese de proteína. Ele faleceu aos 88 anos, em 2004, dois meses antes da morte de Wilkins.

Referências Bibliográficas

KREUZER, H. ; MASSEY, A. **Engenharia Genética e Biotecnologia**. 2 ed. Porto Alegre: Artmed, 2002/

MOREIRA, I. de C. **50 Anos da Dupla Fita**. A Física na Escola, v. 4, n. 1, p 5-7, 2003.

CAPÍTULO 19: TESTES GENÉTICOS DE APLICAÇÃO MÉDICA E NÃO MÉDICA.

Co-autores: Elisete Marcia Corrêa

Patrícia Abrão Possik

Introdução

Os exames laboratoriais são utilizados na prática médica, pois fornecem informações que permitem ao médico concluir o diagnóstico de uma forma mais precisa. Para alcançar maior sensibilidade, especificidade, exatidão e rapidez nos diagnósticos, a indústria tem buscado o desenvolvimento de novos equipamentos, recursos diagnósticos não invasivos e novas abordagens terapêuticas. Paralelamente o rápido avanço do conhecimento científico sobre a biologia molecular e a genética tem sido prontamente incorporados ao diagnóstico e prognóstico clínico.

Apesar de apresentarem uma aplicabilidade prática relativamente distante por empecilhos éticos e técnicos, os testes em DNA têm se tornados cada vez mais atraentes do ponto de vista comercial. Como exemplo de fatia de mercado para estes testes podemos citar as previsões estatísticas: em 2009 ocorrerão 466.730 casos novos de câncer no Brasil (INCA, 2009) e 6% dos 15 milhões de brasileiros com mais de 60 anos sofrerão da Doença de Alzheimer. Estas duas doenças podem ser diagnosticadas, ou previstas, através de testes em DNA. Sem falar dos testes de paternidade que se tornaram uma “febre” e cujo mercado, estimado em 10 milhões de reais, deverá se manter ainda por um bom tempo já que: 30% das crianças brasileiras são registradas como filhos de pai desconhecido e, segundo pesquisadores ingleses, 1 em cada 25 homens não é o pai biológico de seu suposto filho (BELLIS et al, 2005).

Hoje é possível a realização de testes em DNA para variados propósitos, como sexagem fetal, diagnósticos de doenças, identificação humana, análise de vínculo genético, avaliação do prognóstico ou avaliação da resposta viral à terapêutica antiretroviral e testes preditivos de resposta a medicamentos (farmacogenética). Encontram-se disponíveis *online* vários tipos de bancos de dados moleculares que vão da análise de sequências gênicas ao catálogo de distúrbios genéticos e genômicos humanos (*Online Mendelian Inheritance in Man* – OMIM disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=omim>).

Antes de discutir algumas questões relacionadas a estes tipos de testes é importante começar com a descrição do conceito de teste genético. Tal tarefa não é fácil, pois há muita controvérsia quanto à classificação dos diferentes tipos de testes em DNA com aplicação médica e os testes com aplicação não médica (genética forense, vínculo de filiação, etc) em testes genéticos. De acordo com Burke (2002, p. 1865), teste genético é “a análise de DNA, RNA, cromossomos, proteínas e certos metabólitos humanos a fim de detectar genótipos, mutações, fenótipos ou cariótipos relacionados a doenças hereditárias para finalidades clínicas”. Revisando os textos de Sequeiros e Guimarães (2007) observa-se que dependendo do contexto, da finalidade e das instituições internacionais que fazem o uso do teste genético, a expressão teste genético se expande e engloba aplicações como os testes de paternidade e práticas forenses. O HPG (*Human Genome Project*), por exemplo, inclui o teste forense e/ou de identificação humana na categoria de teste genético. As aplicações não-médicas tais como identificação criminal, teste de paternidade, ancestralidade, conhecimento epidemiológico, decisão nutricional, escolha de cosmético, também são incluídas no conceito de teste genético pelo Conselho Nacional de Ética para as Ciências da Vida (CNCV, 2008).

Para outras instituições, no entanto, o conceito ganha uma expressão mais simples considerando testes genéticos apenas os testes em DNA com aplicações médicas.

Neste capítulo, os testes em DNA serão didaticamente agrupados em dois grupos: os testes genéticos de aplicação médica e os testes genéticos de aplicação não médica (sexagem fetal, teste de paternidade). Os testes diagnósticos de doenças infecciosas, apesar de apresentarem comprovada eficiência na detecção molecular do agente patogênico, não serão discutidos por fugirem ao escopo desse capítulo.

Na prática clínica, os testes genéticos podem responder a diferentes objetivos:

- a- **Pré-implantação:** indicado para a detecção de alterações cromossômicas ou gênicas em embriões (de até 7 dias) obtidos por fecundação *in vitro*.
- b- **Rastreio no recém nascido:** indicado para rastrear os principais erros inatos do metabolismo. É popularmente conhecido como “teste do pezinho”.
- c- **Diagnóstico pré-natal:** possibilita a detecção de alterações cromossômicas ou gênicas antes do nascimento.
- d- **Preditivo ou pré-sintomático:** prevê o risco de se desenvolver uma doença de manifestação tardia ou permanecer assintomático, mesmo que tenha herdado a predisposição genética.
- e- **Teste para diagnóstico ou prognóstico:** usado para confirmar ou esclarecer o diagnóstico ou prognóstico em indivíduos com sinais e sintomas de doenças genéticas.

De todas as modalidades de testes genéticos de aplicação médica disponíveis, o teste preditivo é o que mais gera preocupações e discussões éticas uma vez que este antecipa o conhecimento de

que uma pessoa desenvolverá em certo momento de sua vida uma doença genética. Essa doença de início tardio poderá ser monogênica de alta penetrância, na qual o indivíduo portador da mutação possui alto risco de ser afetado (como exemplo, podemos citar a Doença de *Huntington*, ainda sem tratamento eficaz) ou outras de herança complexa (poligênia ou multifatorial) de baixa penetrância, de início tardio, como algumas formas de câncer. Por essas razões é prematuro ofertar diagnósticos preditivos em escala comercial sem a prescrição médica e sem que os profissionais e o público sejam instruídos para lidar com essa informação.

Outro ponto a ser ressaltado é que apesar das doenças genéticas, no contexto atual, poderem ser diagnosticadas através de uma análise molecular, na prática ainda existem limitações, tais como:

a- É muito **difícil determinar a contribuição de uma mutação** gênica ou alteração cromossômica quando esta depende da interação de outros genes e/ou de fatores ambientais como os distúrbios multifatoriais. Por isso, há maiores chances de sucesso quando o gene que será analisado é o principal responsável pelo fenótipo observado (herança monogênica). Nessa categoria estão os testes genéticos para fibrose cística, hemofilia, distrofia muscular de Duchenne, síndrome do X frágil.

b- Há casos em que a **sensibilidade de um teste** não permite detectar 100% das alterações associadas à condição que se está investigando. A falta de sensibilidade pode provir de diversos fatores ou a combinação deles, como por exemplo, limitações metodológicas, a existência de mutações raras não descritas, diversidade de mutações dentro do mesmo gene (por exemplo: Fibrose Cística), mutações em diferentes genes causando o mesmo sintoma (distrofias musculares tipo cinturas), ou mutações dentro do mesmo gene que

levam a prognósticos diferentes. Como o custo destes testes é relativamente alto, é importante certificar-se que o resultado de um único teste trará informações relevantes que auxiliarão no tratamento ou na prevenção da doença.

c- Como já mencionado, a **detecção do portador assintomático (teste preditivo)** pode gerar uma série de implicações éticas e psicológicas. Assim, tais testes deveriam ser prescritos somente em condições que gerem conhecimentos que permitam traçar estratégias que previnam ou retardem o aparecimento dos sintomas.

d- **O consulente e sua família estão sujeitos a vários impactos psicológicos e emocionais** associados à espera e recebimento de todos os possíveis resultados do teste, que precisam ser plenamente esclarecidos. Entre as situações que expõem a família se exemplifica a possibilidade de o teste genético revelar que seu suposto pai não é seu pai biológico e a possibilidade do teste fornecer informação que permita inferir o genótipo de outra pessoa da família que não tenha solicitado o teste.

Nos últimos anos as pesquisas tornaram possível o desenvolvimento de técnicas moleculares mais adequadas à rotina laboratorial, dentre estas se destacam: técnicas de hibridização (*Southern* e *Northern blotting*,); técnicas de amplificação de alvos-específicos como a PCR; PCR-transcriptase reversa (RT-PCR); PCR-ASO (*Allele Specific Oligonucleotide Amplification*); PCR em tempo-real; PCR-RFLP (polimorfismo de tamanhos de fragmentos de restrição); polimorfismo de conformação de fita simples (SSCP); PTT (teste da proteína truncada) e a tecnologia de Arrays (Tabela 19.1).

Tabela 19.1: Síntese de algumas técnicas utilizadas no diagnóstico clínico.

Técnica	Descrição	Possíveis Aplicações
Southern <i>blotting</i>	Fragmentos de DNA são separados por eletroforese em gel de agarose e transferidos para membrana de nitrocelulose por ação capilar. O fragmento de interesse é encontrado via hidridização com sonda radioativa ou fluorescente.	Detecção de mutações e identificação de fragmentos de DNA específicos.
Northern <i>blotting</i>	Fragmentos de RNAm são separados por eletroforese em gel de agarose e transferidos para membrana de nitrocelulose por ação capilar. O fragmento de interesse é encontrado via hidridização com sonda radioativa ou fluorescente.	Detecção da expressão gênica e identificação dos tecidos ou tipos de células que expressam um gene particular.
PCR	Fragmentos seletivos de DNA alvo são amplificados "in vitro"	Rastreamento de mutações, determinação do sexo de fetos, detecção de vírus e organismos patogênicos, detecção de regiões polimórficas.
RT-PCR	RNAm extraído da amostra que se deseja analisar é submetidos a transcrição reversa "in vitro" para a obtenção de múltiplas cópias do cDNA.	Análise de expressão gênica via transcritos.
PCR-ASO ou teste de ARMS (<i>Amplification Refractory Mutation System</i>)	Fragmentos de DNA são copiados em reações de PCR que utilizam 3 <i>primers</i> : dois <i>primers</i> sense que possuem extremidades 3' complementares ao alelo normal ou mutado e um <i>primer</i> antisense complementar a ambos alelos.	Detecção de mutações pontuais específicas.
PCR em tempo real	Amplificação de sequências alvo com o uso de pequenas sondas de DNA marcadas nas extremidades 5' e 3' com compostos fluorescentes.	Análise de expressão gênica, detecção de patógenos, carga viral e de SNPs.
SSCP	Fragmentos de DNA são desnaturados e separados em gel de poliacrilamida. As moléculas de DNA fita simples apresentam alterações na mobilidade eletroforética dependente da sequência nucleotídica.	Rastreamento de mutações
PTT	Isolamento do mRNA transcrição reversa (RT-PCR), transcrição e tradução <i>in vitro</i> e eletroforese	Detecção de mutação pontual e pequenas deleções.

As análises podem ser realizadas em qualquer amostra que contenha células, vivas ou não vivas. Alguns exemplos tradicionais são o sangue periférico, sangue preservado em manchas, fluidos corporais, tecidos embebidos em parafina, unhas, ossos, dentes, raízes de cabelo, sendo que esses últimos são mais utilizados na prática forense.

A seguir serão apresentadas algumas técnicas moleculares empregadas **em testes genéticos de aplicação médica** (PCR, PCR-RFLP e *Arrays*).

PCR (Reação em Cadeia da Polimerase)

A reação em cadeia da polimerase é uma técnica utilizada diariamente nos laboratórios de diagnóstico e pesquisa, pois possibilita a amplificação de um dado fragmento da amostra de DNA inicial de forma exponencial. Graças à existência desta técnica, um teste genético pode ser iniciado a partir de uma única célula, pois o DNA será multiplicado *in vitro* em quantidade suficiente para ser detectado no teste.

A replicação ou amplificação *in vitro* do DNA alvo é catalisada por uma DNA polimerase termoestável que utiliza um par de *primers* (oligonucleotídeos ou iniciadores) específicos que delimitam a sequência alvo. A amplificação cíclica destes trechos de DNA se dá alternando-se a temperatura para a desnaturação das cadeias do DNA (94°C), hibridização dos *primers* (aproximadamente 50-60°C) e finalmente para a ação da polimerase (72°C). Entre as principais técnicas resultantes de modificações da reação em cadeia da polimerase destacam-se o RT-PCR, *nested* PCR, multiplex PCR, PCR-AE (alelo específico) e PCR em tempo real.

O desenvolvimento da PCR convencional tornou possível a investigação de regiões particulares do DNA, como genes ou

polimorfismos ligados a doenças, e o exemplo utilizado é o polimorfismo I/D da enzima conversora de angiotensina (ECA, ou ACE, do inglês **Angiotensin Converting Enzyme**). Essa enzima catalisa a conversão de angiotensina I (decapeptídeo) em angiotensina II, um hormônio octapeptídico ativo. A angiotensina II é um potente vasoconstritor e promove a formação de aldosterona.

Vários polimorfismos já foram descritos para o gene que codifica a ECA e há muitos estudos quanto à ligação destes polimorfismos a problemas cardíacos e outras doenças. O primeiro polimorfismo a ser descrito, e o mais famoso de todos, envolve a presença (inserção – I) ou ausência (deleção – D) de um fragmento de 287 pares de base no íntron 16 do gene que codifica a ECA. Tal mutação influencia os níveis da enzima no plasma e tecidos e consequentemente afeta a pressão arterial. Estudos indicam que os portadores do genótipo DD apresentam duas vezes mais ECA do que indivíduos II, e consequentemente maior risco de serem acometidos por infarto agudo do miocárdio. Já os indivíduos heterozigotos ID possuem níveis intermediários.

O polimorfismo I/D do gene ECA foi descrito em 1990 e inicialmente, o teste era feito pela amplificação da região de inserção do fragmento de 287 pares de base utilizando *primers* que apenas flanqueavam a região de inserção (Figura 19.1). Entretanto, esta estratégia revelou alguns erros no diagnóstico para os indivíduos heterozigotos. A reação de PCR das amostras de indivíduos I/D favorecia a amplificação do alelo D, levando ao resultado D/D em aproximadamente 5% dos indivíduos I/D. Assim, uma reação adicional foi desenvolvida para a confirmação dos portadores do genótipo D/D. Esta nova reação utiliza um novo *primer* interno que reconhece e hibridiza na sequência de inserção, isto é, a presença do produto amplificado é totalmente dependente da presença do alelo com inserção. Caso o resultado seja negativo, o indivíduo é confirmado como D/D.

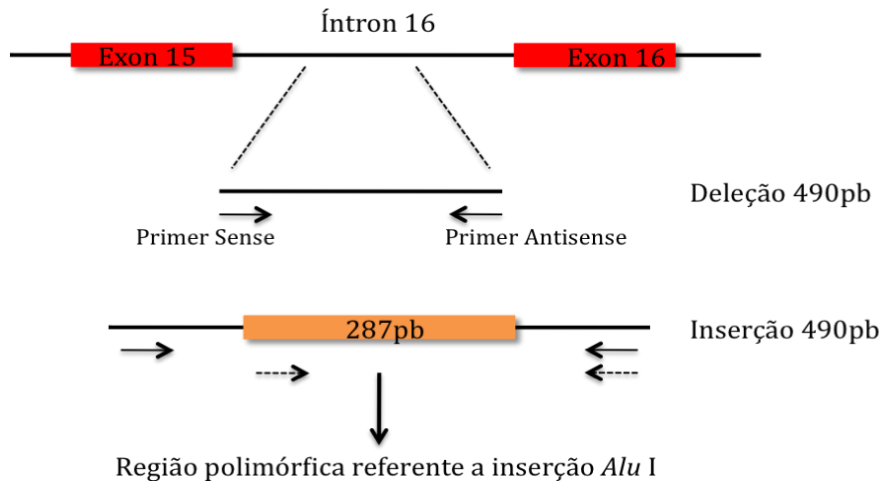


Figura 19.1: Representação esquemática da amplificação de fragmento do íntron 16 do gene ECA. *Primers* sense e antisense flanqueando a região da inserção *Alu I* são utilizados na reação para amplificar o fragmento contendo a Deleção ou a Inserção. Como resultado, os fragmentos amplificados terão 190 ou 490 pares de bases (ou pb), respectivamente. A seta pontilhada representa o par de primers utilizados na confirmação de portadores do genótipo D/D.

No entanto, vale ressaltar que doenças cardiovasculares são doenças complexas e multifatoriais isto é, são influenciadas por uma série de fatores genéticos e ambientais. Sendo assim, há ainda muita controvérsia sobre a participação do polimorfismo ECA neste tipo de doença, assim como quanto à participação de outros genes.

Testes genéticos que investigam regiões particulares do DNA baseiam-se na análise de mutações. Por isso antes de se realizar o teste, é necessário conhecer a ocorrência e a frequência de mutações em determinadas populações, o tipo e a localização da mutação e a sequência do gene ou genes em questão. Tal cuidado se faz necessário para o aumento da sensibilidade de detecção. É importante também lidar com as diferentes frequências de mutações em populações distintas. Por isso um teste desenvolvido em um país não deveria ser diretamente adotado como um método de diagnóstico de rotina em outro sem conhecimento prévio da presença do polimorfismo na população a ser estudada.

Exemplificando, a Fibrose Cística (FC) é uma doença genética autossômica recessiva que atinge principalmente populações de origem caucasóide. O gene possui 230 kb e mais de 1200 mutações já foram descritas. Entretanto, a mutação $\Delta F508$ (caracterizada pela deleção de 3 pb no éxon 10 do gene CFTR que resulta na deleção do aminoácido fenilalanina na posição 508ª da cadeia polipeptídica composta por 1480 aminoácidos) está presente em 70% dos casos mundiais de Fibrose Cística.

Em um estudo no Brasil, a frequência da deleção $\Delta F508$ encontrada entre os 180 indivíduos amostrados no Maranhão foi de apenas 0,8% (MESQUITA, 2001). Por outro lado, na região de Campinas a mutação $\Delta F508$ foi encontrada em 50% dos 140 alelos analisados (CORREIA, 2005) e no Rio de Janeiro, em que a população é resultado de uma grande miscigenação (40% caucasóide, 52% negróide e 8% indígena), a frequência da referida mutação nos 44 pacientes portadores de FC testados foi de 30,7% (CABELLO, 1998). Portanto, para diminuir a possibilidade de diagnóstico falso positivo, na análise dos resultados duvidosos, o teste molecular deve incluir um painel para várias mutações específicas para a região geográfica e os grupos étnicos avaliados.

PCR- RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)

O Polimorfismo no Comprimento de Fragmentos de Restrição (**Restriction Fragment Length Polymorphism**) foi o primeiro diagnóstico baseado no DNA usado para a detecção da anemia falciforme em 1978, por Yuet W. Kan e Andrée Dozy, e no teste pré-natal de Distrofia Muscular de Duchenne em 1985. A técnica baseia-se na habilidade de "cortar" o DNA em fragmentos utilizando enzimas de restrição. A presença de uma mutação no DNA dentro da sequência reconhecida pela enzima de restrição utilizada

resulta na geração de fragmentos de restrição de tamanhos diferentes dos fragmentos gerados a partir do DNA sem a mutação. Desta forma, a técnica permite comparar alelos normais e afetados para cada mutação estudada.

Para a detecção destas diferenças, estes fragmentos de DNA são submetidos à eletroforese em gel de agarose e assim separados por tamanho. No entanto como a enzima atua em muitos pontos do DNA genômico, que é relativamente grande, não se observa bandas definidas no gel, mas sim rastros contendo fragmentos de todos os tamanhos possíveis. Por isso, o DNA presente no gel é transferido por capilaridade para uma membrana (*Southern Blotting*) e esta é hibridizada com uma sonda de DNA capaz de reconhecer a região de interesse no DNA. A auto-radiografia desta membrana revelará finalmente os fragmentos gerados pela restrição do DNA, isto é, os alelos normal e mutado. A comparação entre ambas as amostras permite a elucidação do diagnóstico.

Entretanto, é importante destacar que o DNA deve ser primeiramente submetido a um processo de desnaturação. Quando desnaturado, os fragmentos de DNA se apresentam na forma de fita simples e isso é essencial para que a hibridização com a sonda possa ocorrer. Atualmente, o protocolo otimizado combina a técnica de PCR com a clivagem por enzimas de restrição. Em outras palavras, uma sequência específica de DNA é primeiramente amplificada e então tratada com enzimas de restrição. Como a PCR amplifica apenas a região de interesse no DNA, não é mais necessária a realização do *Southern Blotting*. Esta otimização requer menos DNA e menos tempo para o desenvolvimento do protocolo.

O princípio da técnica também pode ser utilizado para analisar a presença ou ausência de outros tipos de mutação, como inserções e deleções. De fato, o polimorfismo I/D da enzima ECA, descrito anteriormente, foi primeiramente estudado por RFLP. Neste caso, embora a inserção ou deleção não se localize especificamente

na região reconhecida pela enzima de restrição, a clivagem do DNA por esta enzima gera fragmentos distintos de acordo com a presença ou ausência de tais alterações genéticas.

Atualmente, a técnica de PCR-RFLP tem sido empregada no diagnóstico laboratorial da deficiência da glicose-6-fosfato-desidrogenase (G-6-P-D). Esta deficiência é classificada como uma doença hereditária recessiva ligada ao cromossomo X, afetando cerca de 400 milhões de pessoas em todo o mundo. O principal efeito é a redução de G-6-P-D nas células vermelhas do sangue, resultando em icterícia neonatal e anemia hemolítica aguda quando os portadores são expostos a fármacos de poder oxidativo, infecções, acidose diabética ou quando ingerem feijão fava (*Vicia faba*).

A variante africana (G-6-P-D A⁻), presente na África, no Brasil e nos afro-descendentes e a variante mediterrânea (G-6-P-D Mediterrânea) encontrada em italianos, gregos, judeus orientais, árabes e persas são as formas de G-6-PD com atividade enzimática deficiente e, portanto as de maior importância.

O gene codificador da enzima G-6-P-D possui o tamanho de 20 quilobases ou kb e várias mutações já foram descritas. A mais frequente entre os deficientes de G-6-P-D, portadores da variante A⁻, é a mutação de substituição (G→A) no nucleotídeo 202 do éxon 4 que cria o sítio da enzima *Nla* III. Assim quando a mutação está presente, isto é, no caso positivo, o fragmento de 320 pb resultante da amplificação do éxon 4 é clivado pela enzima de restrição *Nla* III em dois fragmentos um de 213 pb e o outro de 97 pb (COMPRI et al., 2000) (Figura 19.2). Para os casos negativos (ausência da mutação) não há a clivagem do fragmento. No entanto, vale ressaltar que a ausência da mutação 202 não exclui a presença de outras mutações neste mesmo gene.

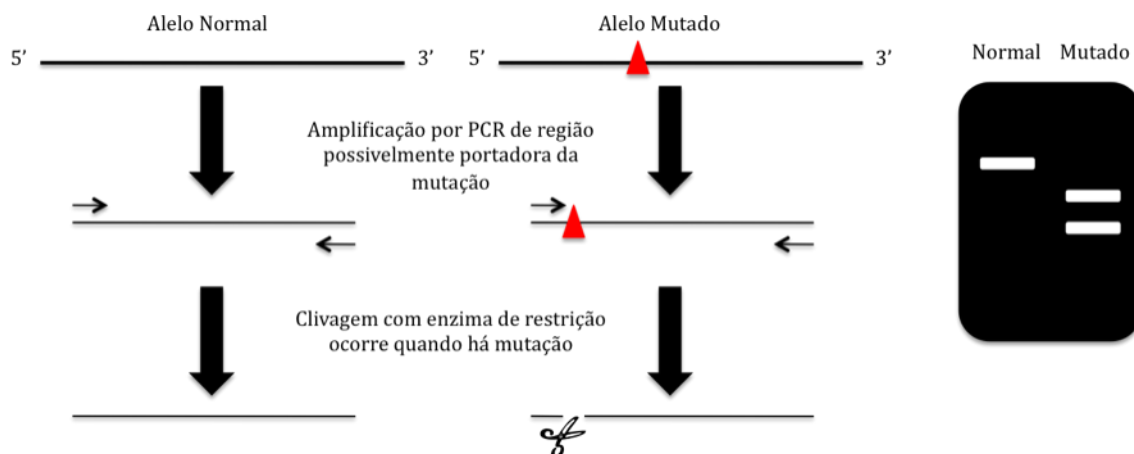


Figura 19.2: Representação esquemática da técnica PCR-RFLP. O fragmento de uma região supostamente afetada por uma mutação (triângulo vermelho) é amplificado por PCR e submetido à clivagem com uma enzima de restrição. Na presença da mutação, a enzima cliva o DNA amplificado em dois fragmentos que são separados por meio de eletroforese em gel de agarose. O alelo normal é representado por uma banda enquanto que o alelo mutado é representado por duas bandas correspondentes aos fragmentos gerados pela clivagem.

Arranjos de DNA (DNA Microarrays)

Microarrays de DNA, também conhecidos como DNA arrays, DNA chips, Biochips e GeneChips, é uma técnica que emprega arranjos (arrays) de fragmentos de DNA roboticamente distribuídos de forma organizada sobre uma lâmina de vidro. O microarrajo de DNA foi inicialmente descrito por Schena et al (1995) e atualmente é uma das principais ferramentas experimentais usada na análise funcional do genoma de diferentes organismos.

O princípio desta técnica baseia-se na hibridização de moléculas de ácido nucléico de uma amostra de interesse em um painel de DNAs complementares fixados individualmente em posições conhecidas de uma plataforma. Em cada uma destas posições,

denominadas *spots*, um fragmento diferente de DNA estará representado. Geralmente estas plataformas contêm DNAs de simples fita que são representativos de todo o genoma de um organismo, como por exemplo, o genoma humano.

Uma das aplicações pioneiras dos Microarranjos de DNA foi o estudo da expressão gênica. Para analisar o padrão de expressão gênica de amostras de órgãos, tecidos ou mesmo culturas de células *in vitro*, extrai-se RNAm da amostra e produz-se o DNA complementar (cDNA) *in vitro*. Os cDNAs de simples fita, provenientes das amostras de interesse e marcados com um fluorocromos (Cy3 e Cy5, por exemplo), hibridizarão nos spots que contenham moléculas complementares (Figura 19.3).

Geralmente, a amostra biológica controle (referência) é marcada com um fluorocromo verde (Cy5). O outro fluorocromo (vermelho, Cy3) é utilizado para marcar o cDNA proveniente do objeto de estudo. Um exemplo típico da aplicação dessa técnica é a comparação de tecidos normais com tecidos tumorais ou tecidos com outras disfunções. Outro exemplo é a utilização para estudo das diferenças entre tumores tratados e não tratados com certo medicamento.

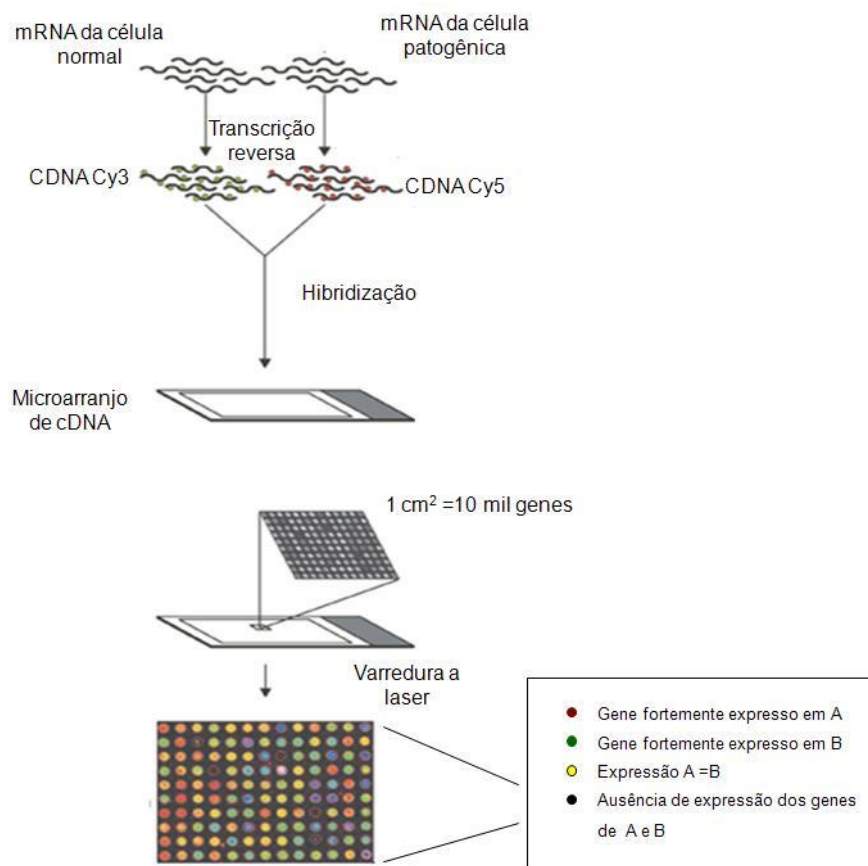


Figura 19. 3: Microarranjo de cDNA. O mRNA é isolado a partir de duas linhagens de células (normal e patogênica). Os cDNAs são obtidos por transcrição reversa e marcados com os corantes Cy3 e Cy5, respectivamente. Os cDNAs são misturados e hibridizados em uma disposição ordenada de sequências de DNA de simples fita conhecidas. Após a hibridização o arranjo é lido sob luz fluorescente e os dados são processados com o uso de *softwares* específicos. Os *spots* que emitem luz verde e vermelha representam genes expressos na célula normal e patogênica, respectivamente, a emissão amarela indica genes expressos nas duas linhagens celulares e a ausência de emissão (preto) representa genes que não são expressos em nenhuma das células.

Após a hibridização, o *array* é exposto a raios laser que excitam os fluoróforos fazendo com estes emitam luz (fluorescência). As intensidades de fluorescências representadas pelas cores verde e vermelho, isto é Cy3 e Cy5, em cada *spot* reflete o nível de expressão de um dado gene nas duas amostras. Esse tipo de hibridização

denominada de hibridização competitiva (sistema de duas cores) gera sinais que são processados por programas de computadores apropriados para a armazenagem e manuseio dos arquivos gerados. Devido ao grande número de informações que são geradas em um único experimento, sua análise e interpretação são bastante complexas e requerem o auxílio de especialistas em bioinformática.

Os microarranjos podem ser constituídos por cDNAs ou oligonucleotídeos. As plataformas com *spots* de cDNA podem ser confeccionadas em lâminas de vidro (*microarray*) ou em membranas de náilon (*macroarray*). As plataformas de oligonucleotídeos são montadas por simples depósito das moléculas na lâmina ou os oligonucleotídeos são sintetizados sobre o substrato mediante a tecnologia da fotolitografia (um tipo de síntese baseada na tecnologia de semicondutores). Desta maneira, diversos tipos de lâminas produzidas por empresas como *Affymetrix*, *Agilent*, *Illumina* ou por instituições de pesquisa e universidades estão comercialmente disponíveis.

O estudo da expressão gênica utilizando a técnica de Microarray vem sendo muito utilizado, principalmente em laboratórios de pesquisa, para a caracterização de *assinaturas moleculares*, ou seja, a identificação de um conjunto de genes que são característicos de um processo biológico ou de um fenótipo específico, como certas doenças. Como resultado, o investigador pode identificar genes candidatos para o envolvimento nesses processos ou doenças, e esta informação pode ser futuramente utilizada para a pesquisa de medicamentos, desenvolvimento de novos marcadores para diagnóstico, desenvolvimento de marcadores de resposta a medicamentos, e assim por diante.

Embora muito utilizada para a análise da expressão gênica, variações da técnica permitiram a utilização desta para outras finalidades, como para a detecção de mutações, polimorfismos, comparação do mapeamento de genes ativos e inativos na célula

normal e na patológica, etc. Isso indica que **as aplicações dessa tecnologia nas ciências clínicas** estão se materializando a medida que os conhecimentos multidisciplinares avançam (Tabela 19.2).

Tabela 19.2: Aplicações do microarranjo de cDNA nas ciências clínicas.

Ciências Clínicas	Aplicações
Endocrinologia	Identificação de genes envolvidos na diferenciação celular com o uso de células transfectadas; análise de efeitos regulatórios de hormônios na expressão gênica de vários tecidos no organismo
Microbiologia	Parte-se do sequenciamento do genoma completo do microorganismo: para analisar o padrão de expressão gênica e entender a funcionalidade na identificação de genes importantes para o desenvolvimento de fármacos e moléculas inibidoras de seus mecanismos patogênicos.
Imunologia	Análise de expressão gênica do sistema imune em condições normais, auto-imune e em doenças infecciosas.
Oncologia	Análise da expressão gênica para identificar genes envolvidos no processo de desenvolvimento do tumor; Análise do padrão de expressão gênica para classificação e diagnóstico de câncer; Análise comparativa do perfil de expressão gênica de tumores benignos e malignos; Abordagem genômica para gerenciamento e tratamento do câncer de mama.
Toxicogenômica	Análise do perfil de expressão gênica de células expostas de novas drogas destinadas ao uso medicinal.
Desenvolvimento	Análise comparativa do perfil de expressão gênica em organismos distintos como bactérias, fungos, nemátodos, Drosófila e camundongos.
Genética	Análise e identificação de mutações específicas no genoma de indivíduos, famílias e populações.
Gerontologia	Análise comparativa do perfil de expressão gênica de tecidos de diferentes idades para a identificação de genes envolvidos no processo de envelhecimento e doenças ligadas ao envelhecimento.

Fonte: MELLO-COELHO e HESS (p. 1549, 2005).

Uma das variações da técnica de Microarranjos é a Hibridização Genômica Comparativa (CGH). Esta técnica foi desenvolvida para a investigação de aneuploidias genéticas, isto é, alteração de cópias de DNA no genoma. Antes da era dos *Arrays*, esta técnica era realizada pela hibridização do DNA genômico extraído da amostra de interesse e de uma amostra controle (representando a referência) a uma superfície contendo cromossomos metafásicos. O padrão de fluorescência ao longo dos cromossomos servia de indicativo de ganhos e perdas de cópias de DNA. Com o advento dos *Chips* de DNA, plataformas contendo DNA genômico ou cDNA são utilizadas ao invés de cromossomos metafásicos. A razão da fluorescência nos *spots* de DNA indica as variações no número de cópias das determinadas regiões do DNA, mapeando o genoma para possíveis alterações cromossômicas.

A técnica de CGH é muito utilizada no monitoramento de câncer. Em tumores de mama, por exemplo, algumas alterações no número de cópias de regiões do cromossomo 20 são comuns e estão associadas ao prognóstico da doença. A identificação da presença ou ausência destas alterações no paciente pode contribuir para o tratamento e monitoramento da evolução do câncer. CGH *arrays* são também muito utilizados em pesquisas para a identificação de novos marcadores moleculares para certos tipos de cânceres, na identificação de genes ou regiões cromossômicas envolvidas no desenvolvimento e progressão desta patologia assim como na resposta a terapias (PESTOVA et al. 2004).

Estimativas apontam que nos Estados Unidos, mais de 10000 testes genéticos por CGH são desenvolvidos anualmente. Dentre estes, alguns usam plataformas que contem a representação completa do genoma humano. Entretanto, a maioria utiliza plataformas menores que especificamente acessam o número de cópias relativas de regiões críticas em algumas doenças ou síndromes (LEE et al., 2007).

Além desta abordagem para verificar variações em número de cópias, algumas plataformas contêm moléculas de DNA com mutações (como deleções ou inserções) associadas a determinadas doenças ou polimorfismos. Estas plataformas são utilizadas para a identificação de genes envolvidos em doenças humanas ou na predisposição a estas doenças, ou ainda na resposta a terapia. Cada uma destas mutações ou polimorfismos está representada em um *spot* da plataforma. O método se baseia no mesmo princípio do *Microarray* utilizado para a análise da expressão gênica ou na Hibridização Genômica Comparativa: o DNA da amostra em questão é hibridizado com este painel. Entretanto, a hibridização só ocorrerá se a amostra do paciente possuir um dado polimorfismo ou mutação, sendo assim possível identificar os polimorfismos presentes na amostra do paciente.

A busca de pequenas variações no genoma, os chamados SNPs (lê-se *snips*) (polimorfismos de nucleotídeo único), que ocorrem mais frequentemente em pessoas com certa doença, tem sido adotada como método de diagnóstico ou prognóstico.

Os SNPs formam a classe de polimorfismos genéticos mais freqüentes entre os humanos. A alteração de um nucleotídeo por outro em regiões ao redor dos genes são muito frequentes e podem agir como marcadores moleculares, auxiliando na localização de genes associados a doenças. Entretanto, quando o SNP ocorre dentro de um gene, ou muito próximo a ele, pode influenciar diretamente a função deste e conseqüentemente, contribuir para o desenvolvimento de um fenótipo alterado. Alguns SNPs podem auxiliar na predição de resposta a certos medicamentos, de susceptibilidade a certos fatores ambientais, como toxinas, e de risco de desenvolvimento de certas doenças.

Utilizando a técnica de microarray, é possível identificar centenas e milhares de SNPs ao mesmo tempo. Investigadores utilizam este método para a identificação de genes que contribuem

para o risco da pessoa desenvolver certos tipos de doenças. De fato, utilizando este tipo de abordagem, já foram identificados diversos SNPs envolvidos em disfunções como diabetes, anormalidades cardíacas, doença de Parkinson e Doença de Crohn. Além do mais, é possível utilizar esta abordagem para identificar polimorfismos associados à resistência a terapias.

Para ilustrar como um investigador pode usar informações obtidas em um SNP array, consideramos a resposta a certo medicamento como o objeto da pesquisa. Se tivermos dois grupos de pacientes, um respondedor e outro não, o pesquisador vai procurar no DNA destes pacientes SNPs que se repetem e que são exclusivos para um dos dois grupos. Este grupo de SNPs poderá futuramente ser utilizado para a identificação de pacientes com alta chance de responder ao tratamento com este medicamento.

Além das aplicações na área médica já discutidas, algumas técnicas moleculares são também utilizadas para a realização de testes que não possuem aplicação médica. Dentro das opções de técnicas moleculares sem aplicação médica e cujos resultados são oferecidos diretamente ao público consumidor temos os testes de paternidade e sexagem fetal (determinação precoce do sexo fetal por volta da 7 semana) por análise do sangue materno. Há ainda outros que não são oferecidos diretamente ao público, mas atendem a genética forense e os estudos de genética de populações tais como a identificação humana através da análise do DNA.

Os testes de identificação humana podem ser utilizados no auxílio à justiça na identificação de criminosos; no reconhecimento de vítimas em acidentes em massa como no Tsunami (Tailândia), atentado ao *World Trade Center* (Estados Unidos) e queda de avião como no caso do *Airbus A330-200 da Air France*, (voo 447) no Brasil; no entendimento científico sobre a formação nos estudos evolutivos;

e migratórios e na caracterização das variantes genéticas associadas a certas doenças.

Sexagem Fetal

É uma técnica que permite diagnosticar precocemente o sexo fetal por meio da análise de DNA fetal presente no plasma materno, além de posteriormente permitir a realização do diagnóstico pré-natal não invasivo de outras enfermidades tais como β -talassemia, doença falciforme, acondroplasia, hemofilia, doenças com padrão de herança recessiva ligada ao X e outras como a aloimunização Rh e pré-eclâmpsia.

A partir do primeiro trimestre de gestação as células fetais aparecem na circulação maternal e só desaparecem 2 a 3 horas após o parto. À medida que a idade gestacional vai avançando há um aumento da quantidade de DNA fetal que por volta da 5ª a 6ª semana de gestação já é próxima a 10 cópias do DNA fetal/mL de plasma (MARTINHAGO, 2006).

A determinação do sexo fetal através da técnica de PCR, (convencional, *nested* ou em tempo real) a partir da 8ª semana vem sendo descrita por laboratórios de diferentes países. Este teste se baseia na amplificação a partir do DNA livre fetal presente no plasma materno, de alguns marcadores do cromossomo Y que podem ser: o DYS14 (presente em múltiplas cópias), o gene SRY (responsável pela diferenciação testicular e determinação do fenótipo masculino e presente em cópia única) ou mais recentemente o gene TSPY (*Tests-Specific Protein Y-encoded*). Como apenas indivíduos do sexo masculino carregam o cromossomo Y, sua presença indica um menino e por exclusão sua ausência indica uma menina.

Para a realização do exame é necessária a coleta do sangue materno, extração do plasma e amplificação do fragmento alvo por PCR utilizando-se, por exemplo, os *primers* para o gene SRY.

Como controle de amplificação todos os extratos devem ser submetidos à amplificação de um fragmento do gene da β -globina humana. A amplificação de um fragmento de 472pb do gene SRY (COSTA, et al, 2008) deve ser interpretada como indicativo de feto do sexo masculino.

O teste de sexagem fetal não é indicado para gestação inferior a 7 semanas, devido a pouca disponibilidade de DNA fetal, o que pode levar a resultados inconclusivos.

Teste Paternidade

Desde a análise de DNA *Fingerprinting* (identificação genotípica) proposta por Alec Jeffreys na década de 80, a determinação da identidade genética pelo DNA revolucionou a genética forense e se tornou rotineiramente aceita em processos judiciais.

A identificação humana por DNA, por ser uma poderosa ferramenta na identificação de vínculo genético, popularizou os testes de paternidade. No Brasil esses testes são feitos em laboratórios particulares (com ou sem autorização judicial) e nos laboratórios públicos (com recursos do Estado). Para maior comodidade, quando o teste for apenas informativo e sem necessidade de ter valor judicial, o indivíduo pode adquirir o Kit do laboratório, coletar a amostra e enviá-la via correio para o laboratório.

O método mais utilizado na determinação da vinculação familiar é a análise das regiões polimórficas do DNA, ou seja, regiões que apresentam variabilidade genética. Essas regiões são pequenas sequências (unidades) não codificadoras, que se repetem um número variável de vezes em *tandem* (consecutivamente) e são denominadas de minissatélite ou VNTRs (*variable number of tandem repeats*) e

microssatélite ou STRs (*short tandem repeats*). Cada unidade varia de 2 a 7 nucleotídeos nos microssatélites (KASHYAP, et al. 2004) ou de 8 a 80 nucleotídeos nos minissatélites (Jeffreys et al. 1985).

O número de vezes que cada unidade se repete por *locus* (local específico do DNA) é variável e específico para cada indivíduo. Em outras palavras, embora todos os indivíduos possuam o locus para, por exemplo, o VNTR D17S39, o número de repetições das unidades básicas do microssatélite varia de indivíduo para indivíduo, ou seja, cada indivíduo possui um alelo diferente. Na verdade, cada indivíduo pode ainda possuir 2 alelos diferentes, (herdadas da mãe e do pai seguindo o padrão mendeliano) (Figura 19.4).

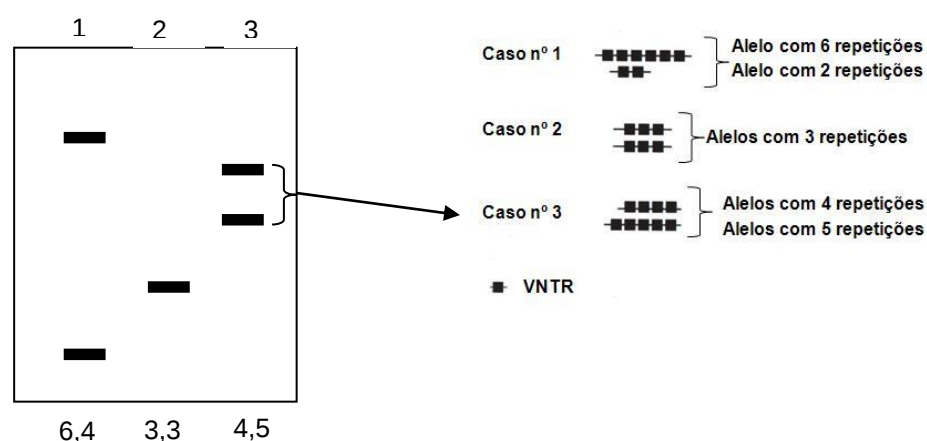


Figura 19.4: Polimorfismos de microssatélites separados na eletroforese. Os minissatélites ou microssatélites presentes em cada alelo (um paterno e outro materno) podem possuir números de repetições diferentes.

Há várias abordagens que podem ser utilizadas nos testes de paternidade entre elas as mais significativas são: o uso de sondas unilocais e multilocais além do PCR.

a- Testes de Paternidade com Sondas Unilocais

As sondas unilocais permitem a análise de apenas um locus VNTR de cada vez, pelo método do polimorfismo de tamanho de fragmentos de restrição (RFLP). Esse método consiste na extração do DNA, clivagem com uma endonuclease específica, eletroforese para a separação dos fragmentos de DNA, transferência para uma membrana (*Southern Blotting*) e hibridização com uma sonda de DNA. A sonda se hibridiza com a unidade básica de repetição, especificamente marcada, e a detecção do produto complementar a sonda é feita por fluorescência ou radioatividade. A clivagem gera fragmentos de tamanhos diferentes de acordo com o número de repetições presentes no VNTR. Como os alelos de VNTR possuem repetições diferentes, os fragmentos resultantes terão tamanhos diferentes. Assim, o padrão de bandas resultantes permite distinguir duas pessoas exceto gêmeos univitelinos.

As sondas unilocais são adotadas por alguns laboratórios por serem sensíveis e facilmente interpretadas. No entanto, seu uso se torna preciso somente quando o laboratório consulta um banco de dados, das frequências de repetições polimórficas nas populações, obtido com as mesmas técnicas usadas na determinação de paternidade e aplicado na mesma população que o indivíduo alvo faz parte.

b- Testes de Paternidade com Sondas Multilocais (impressões digitais do DNA)

As sondas multilocais são conjuntos de sondas que reconhecem simultaneamente vários VNTRs presente em *loci* (plural de *locus*) distintos, diferentemente das sondas unilocais. Como resultado é gerado um complexo sistema de bandas resultantes das hibridizações que é altamente discriminatório e por isso essa técnica

ficou conhecida como *DNA Fingerprinting* (impressão digital do DNA). Existem muitas sondas multilocais para *loci* de VNTRs sendo que os mais tipados são D1S7, D2S44, D4S139, D5S110, D10S28 e D17S39. No Brasil, o uso de sondas multilocais não-isotópica (sonda F10) foi introduzido em 1988 por um grupo de pesquisadores da UFMG.

A análise dos marcadores VNTRs através da técnica RFLP com sondas multilocais é tão precisa que o uso de 5 sondas de VNTR já possibilita a precisão de acerto da paternidade acima de 99,999% (GÓES, RB, nº 65). No entanto, essa técnica não é utilizada pela maioria dos laboratórios por ser laboriosa, necessitar de DNA íntegro e em grandes quantidades.

c- Testes de Paternidade PCR/STR (ou repetições curtas)

A técnica PCR/STR é a mais utilizada pela maioria dos laboratórios. Consiste na amplificação via PCR dos microssatélites de até 400 pb e apresenta a vantagem de ser usada em situações em que a quantidade de DNA inicial é pequena. Após as análises eletroforéticas dos diferentes alelos que representam os *loci* de microssatélites infere-se pela inclusão ou exclusão da paternidade (Figura 19.5).



Observa-se que o primeiro alelo de F (Filho) representado em vermelho é coincidente com o primeiro alelo de M (mãe). O 2º alelo de F (representado em verde) por exclusão, seu alelo paterno, não migra na posição de nenhum dos alelos do suposto pai (SP). Neste caso, o suposto pai **está excluído** como pai biológico de F.

Observa-se que o primeiro alelo de F (Filho) representado em vermelho é coincidente com o primeiro alelo de M (mãe). O 2º alelo de F (representado em verde) por exclusão, seu alelo paterno, migra na posição de um dos alelos do suposto pai (SP). Nesse caso, trata-se de um caso de **inclusão** de paternidade.

Figura 19.5. Análise de regiões de STR em teste de paternidade.

Quando mais de dois alelos paternos do filho não são coincidentes com os alelos do suposto pai conclui-se pela exclusão da paternidade (JOBIM, et al., 2008).

Vale ressaltar que a garantia do resultado só será alcançada se o perito realizar o teste utilizando 2 sondas multilocais, ou 6 sondas unilocais ou pelo menos 15 microssatélites STRs/PCR (PENA, 1997).

Quando o suposto pai não puder ser excluído de ser o pai biológico, isto é, quando não houver exclusão de uma paternidade falsamente imputada, calcula-se o índice de paternidade, a probabilidade de paternidade e a probabilidade de exclusão que expressam a verossimilhança com que o suposto pai pode ser declarado pai biológico da criança.

Contudo, para se chegar a um resultado confiável, é necessária uma análise estatística sobre a frequência dos alelos paternos presentes na população da qual o suposto pai faz parte. No Brasil a distribuição de frequências alélicas parece não variar significativamente entre os diferentes grupos étnicos mesmo com a forte miscigenação (GÓES, 2005). No entanto, bancos de dados alélicos brasileiros têm sido criados e possibilitarão futuramente que as referências alélicas da população dos EUA deixem de ser utilizadas nos testes em DNA brasileiros.

Com o avanço da tecnologia, 15 *loci* de STRs podem ser amplificados em uma única reação de PCR utilizando-se vários pares de primers (PCR multiplex) ou então cada *locus* de microssatélite é amplificado usando *primers* marcados com diferentes corantes fluorescentes (PCR/STRs fluorescente). A seguir o produto amplificado é detectado através de seus respectivos tamanhos, através da migração em gel de eletroforese capilar. Comercialmente estão disponíveis vários kits para a análise automatizada em sistemas *multiplex* fluorescente tais como: *Profiler PlusTM* (analisa 10 marcadores), o kit *Power Plex[®]* (para 16 STRs), e o *IdentifilerTM* (16 marcadores) (KASHYAP *et al.*, 2004).

Prática Forense

A prática forense permite a identificação de pessoas através da aplicação de técnicas científicas dentro de um processo legal. Pode ser utilizada para a identificação de cadáveres e restos humanos em casos de desastres em massa, em casos de exumação de restos biológicos para determinação de vínculo genético e em investigação criminal.

Os métodos laboratoriais empregados na prática forense são os mesmos usados nos testes de paternidade, ou seja, a

investigação recorre à extração do DNA seguido da amplificação de regiões do genoma que apresentam maior variabilidade genética, como os micro e minissatélites descritos anteriormente.

Qualquer tipo de tecido ou fluido biológico pode ser utilizado como fonte de DNA, no entanto uma pesquisa recente, realizada por pesquisadores da Faculdade de Odontologia de Piracicaba (FOP), indica que o contato do tecido ósseo com temperatura acima de 400°C por 10 minutos resulta em danos que impedem a análise do DNA. Esse dado é muito importante e deve ser considerado antes de se tentar esclarecer um inquérito utilizando a análise do DNA para identificar vítimas, uma vez que o sucesso da análise depende do tipo de amostra e de como ela foi preservada.

Seguindo essa mesma linha faz-se necessário avaliar a resistência do DNA de cadáveres ou partes deles que ficaram submersos ou imersos na água por muito tempo. Sabe-se que a taxa de degradação do DNA é dependente da temperatura, umidade, intensidade de luz e contaminação por microorganismos.

Como dentes e ossos são os elementos corpóreos mais resistentes a fatores exógenos, MUSSE (2007) analisou o potencial de recuperação do DNA obtido de dentes humanos imersos na água doce e salgada e observou que o DNA extraído de dentes imersos em água doce apresentou maior sucesso de amplificação.

Quando o DNA nuclear não oferecer condições adequadas para a análise, isto é, quando estiver muito degradado (incêndios, desastres aéreos) ou não disponível como nos fragmentos de cabelo sem bulbo, pode-se recorrer ao DNA mitocondrial (mtDNA).

O DNA mitocondrial é encontrado em uma organela citoplasmática denominada mitocôndria e possui 16.569 nucleotídeos arranjados em uma dupla fita circular. Uma fita ou cadeia H (*heavy*) é rica em guaninas e a outra, a cadeia L (*light*) é rica em citosinas. Os genes presentes no mtDNA codificam RNA ribossômico e de transferência e algumas enzimas da cadeia fosforilativa.

A maior parte de seu genoma é codificante, no entanto, existe uma região de aproximadamente 1 kb denominada de região *D-loop* ou região controle. A *D-loop* possui duas regiões, HV1 e HV2, hipervariáveis que tem sido explorada para a identificação humana.

DNA mitocondrial, cromossomo Y e antropologia

Desde o final dos anos 80, os estudos baseados em análises de DNA mitocondrial e do cromossomo Y têm contribuído para o melhor entendimento de questões antropológicas.

Através da transmissão dos haplótipos (bloco de genes transmitidos dos pais para os filhos) do mtDNA e do cromossomo Y é possível estudar as populações atuais, fazer inferências sobre as raízes filogenéticas passadas e estudar populações passadas (DNA obtido de múmias ou ossadas arqueológicas) para reconstituir importantes informações genéticas sobre a evolução humana. Porém é importante destacar que o estudo dos haplótipos do cromossomo Y só fornece informações sobre os antepassados do sexo masculino enquanto, que os haplótipos mtDNA só permite resgatar informações sobre os antepassados do sexo feminino.

O cromossomo Y apresenta três partes distintas. Duas pequenas regiões homólogas ao cromossomo X que se recombina com este, e uma terceira parte (mais de 90% do cromossomo) que é exclusiva do Y e é doada em bloco sem recombinação de pai para filho. Essa região do cromossomo Y tem sido utilizada também para realizar teste de paternidade quando a mãe já é falecida ou se recusa a participar da perícia, ou em situações forenses quando há contaminação de amostras biológicas de um homem e de uma mulher.

No Brasil, os marcadores de linhagens genealógicas masculina (patrilinear) e feminina (matrilinear) foram utilizados por Pena (1997), para entender o quanto das genealogias

ameríndias, européias e africanas contribuiu para a composição da população brasileira. Os resultados obtidos indicam que a imensa maioria das patrilinhagens é européia, enquanto que a matrilinearidade é composta por 33% de ameríndias, 28% de africanas e 39% de européias. Em outras palavras 114 milhões de brasileiros têm herança materna ameríndia ou africana.

Os estudos mostram que as contribuições do mtDNA e do cromossomo Y podem servir também para reconstruir as rotas de migração humana (estudos indicam que a população humana descende de um ancestral comum denominado mitocôndria de EVA), estudar a origem do homem no continente australiano (KUMAR, et al, 2009) e no americano.

A possível rota de migração para a América do Sul, segundo um estudo publicado em 2008, na *American Journal of Physical Anthropology* por uma equipe de geneticistas brasileiros (Bortolini, Santos e Bonatto) e um antropólogo (González-José), se deu em uma única grande onda de migração vinda do norte da Ásia via estreito de *Bering* há 18 mil anos atrás. Através da análise do mtDNA, do cromossomo Y e de dados anatômicos de crânios de populações extintas, a equipe concluiu que toda a diversidade biológica humana presente nas Américas descende desse grupo primordial de caçadores-coletores.

Por isso, Pena e colaboradores defendem o argumento de que raça é apenas uma definição **social** (baseado em características físicas) e **cultural**, já que do ponto de vista genético não houve entre os diferentes povos variabilidade suficiente para que certos grupos possam ser classificados biologicamente como raças. Vale lembrar que do ponto de vista de genoma dois indivíduos diferem em apenas 0,01% dos 3,0 bilhões de pares de base que compõem o DNA genômico.

As diferenças fenotípicas observadas é resultado do processo de seleção natural que fixou alterações adaptativas que

permitiram melhor adequação as diferentes regiões climáticas que o homem habitou (exemplo: cor de pele, tipo de cabelo, forma do nariz, etc.) (AZEVEDO, 1987). “Mesmo doenças ditas 'raciais', como a anemia falciforme, decorrem de estratégias evolucionárias de populações expostas a agentes infecciosos específicos” (PENA, 2005).

Em adição, a discussão sobre o conceito de raça é um dos temas mais controversos e discutidos entre geneticistas e profissionais de saúde, uma vez que esses últimos adotam cor e/ou ancestralidade biológica como indicadores de predisposição a doenças ou de resposta a fármacos (ALVES, et al. 2005). Embora biólogos e geneticistas não aceitem a existência do conceito de raça é “fato que variações na frequência de fatores genéticos e não-genéticos afetam as taxas de doença e resposta terapêutica a medicamentos em diferentes populações” (ALVES, et al. 2005, p.112).

Agradecimentos

À Profª Drª Daniela M. Neo Justino, professora do Centro Universitário Central Paulista São Carlos - SP, ao e MSc Wilson Malagó Junior, Bacharel e Licenciado em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de São Carlos e Mestre em Genética e Evolução pela mesma Universidade.

Referências Bibliográficas

ALVES, C; FORTUNA, C. M. M; TORALLES, M. B.P. Aplicação do Conceito de Raça em Saúde Pública. **Gaz. Méd. Bahia**. v.75, n1, p. 92-115, Jan-Jun, 2005.

AZEVEDO, E. S. **Raça Conceito e Preconceito**.São Paulo: Editora Ática, 62p, 1987.

BELLIS, M. et al. Measuring paternal discrepancy and its public health consequences. **J Epidemiol Community Health**. v.59, n 9. p. 749-754, September, 2005.

BURKE, W. Genetic testing. **N Engl J Med**, n. 347, n. 23. December, p. 1867-1875, 2002.

CABELLO, G. M. K de. **Fibrose Cística: Abordagem Epidemiológico-Molecular em Amostras do Rio de Janeiro**, 1998. Disponível em <<http://ensino.ioc.fiocruz.br/teses/site/detalhamento.asp?id=BCM-M-099>> Acesso em: 12/08/2009.

COMPRI. M. B.; SAAD; S. T. O; RAMALHO. A. S. Investigação genético-epidemiológica e molecular da deficiência de G-6-PD em uma comunidade brasileira. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, 16(2):335-342, abr-jun, 2000.

CONSELHO NACIONAL DE ÉTICA PARA AS CIÊNCIAS DA VIDA (CNCV). **Relatório – venda directa de testes genéticos ao público**, 2008. Disponível em <www.cneqv.gov.pt/.../Relatorio_P056CNECV_Vendatestesgeneticos.pdf> Acesso em 10/09/2009.

CORREIA, C. A. de A. **Prevalência de seis mutações no gene CFTR em portadores de fibrose cística da região de Campinas**, 2005. Disponível em <<http://libdigi.unicamp.br/document/?code=vtls000374307>> Acesso em: 09/08/2009.

COSTA, E. O. A. et al. **Determinação do sexo fetal através da análise de DNA no plasma materno**. Resumos do 54º Congresso Brasileiro de Genética • 16 a 19 de setembro de 2008. Disponível em <<http://web2.sbg.org.br/congress/sbg2008/pdfs/25742.pdf>>.Acesso em 31/07/2009.

INCA. Estimativa/2008. Incidência de câncer no Brasil. Disponível em<<http://www.inca.gov.br/estimativa/2008/versaofinal.pdf>> Acesso em: 31/07/2009

GÓES, A. C. de S. Análise de regiões polimórficas do DNA com o objetivo de estabelecer vínculos genéticos, identificar restos mortais ou realizar perícias criminais. **Revista do Biomédico**, Edição n. 65, 2005. Disponível em <http://www.crbm1.gov.br/bio65/artigocien_65.asp> Acesso em: 31/07/2009.

JEFFREYS, A. J et al. Individual-specific 'fingerprints' of human DNA. **Nature**, v. 316, p. 76-79, 1985.

JOBIM, M. R. Novos testes de DNA na investigação de paternidade com o suposto pai falecido. **RT/Fasc. Civ.** v.874, n.97, p. 55-69, 2008. Disponível em <http://www.dnareference.com.br/pdf/ARTIGO_Novos_Testes_de_DNA.pdf> Acesso em: 31/07/2009

LEE, C., et al. Copy number variations and clinical cytogenetic diagnosis of constitutional disorders. **Nature Genetics**, 39(7 Suppl):S48-54, jul, 2007.

KASHYAP, V.K.; SITALAXIMI T.; CHATTOPADHYAY P.; TRIVEDI R. DNA Profiling Technologies in Forensic Analysis. **Int. J. Hum. Genet**, v. 4, n. 1, p 11 - 30, 2004. Disponível em <www.krepublishers.com/...Kashyap/IJHG-04-1-011-030-2004-Kashyap.pdf> Acesso em: 31/07/2009

KUMAR, S. et. al. Reconstructing Indian-Australian phylogenetic link. **BMC. Evolutionary Biology**. v. 9. n. 173, p. 1471-2148, 2009.

MARTINHAGO, C. D. Determinação precoce do sexo fetal pela análise do DNA no plasma materno. **Rev Bras Ginecol Obstet.** v. 28, n. 3, p. 190-4, 2006.

MELLO-COELHO V. de.; HESS, K. L. A conceptual and practical overview of cDNA microarray technology: implications for basic and clinical sciences. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 38, n.10, p. 1543-1552. 2005. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-879X2005001000011&script=sci_arttext> Acesso em: 03/09/2009.

MESQUITA, E. R. do R. B. P. L. **O gene da fibrose cística em diferentes grupos populacionais**, 2001. Disponível em <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/41/41131/tde-19102001-130054/>> Acesso em: 03/09/2009.

MUSSE, J. de O. **A influência do meio aquático nos processos de identificação humana**: estudo epidemiológico e laboratorial (recuperação do DNA. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/23/23148/tde-16052007-120412/>> Acesso: 03/09/2009.

PENA, S. D. O DNA como (única) testemunha em determinação de paternidade. **Rev. Bioética**. Ed. CFM, Brasília, v. 5, n.2, p. 231- 241, 1997.

PENA, S. D.J. Razões para banir o conceito de raça da medicina brasileira. **Hist. Cien. Saúde-Manguinhos**. v.12, n.2. Rio de Janeiro. Mar/Ago., 2005.

PESTOVA, E. et al. Microarray-Based CGH in Cancer. **Methods in molecular medicine (Methods Mol Med)**. v. 97, p 355-375 , 2004.

SCHENA, M; SHALON, D; DAVIS, RW; BROWN, PO. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. **Science**, v. 270, p. 467-70, 1995.

SEQUEIROS, J.; GUIMARÃES, B. **Definitions of Genetic Testing (4th draft)**, 2007. Disponível em <<http://www.eurogentest.org/web/info/public/unit3/DefinitionsGeneticTesting-3rdDraf18Jan07.xhtml>> Acesso em: 18/08/2009.

CAPÍTULO 20: A ANÁLISE DE DNA POR ELETROFORESE

Co – autores: Elisete Marcia Corrêa

Patrícia Abrão Possik

Eletroforese de DNA em gel

A análise de DNA por eletroforese é uma das técnicas fundamentais nos laboratórios de pesquisa e de diagnóstico. O princípio é baseado no fato da molécula de DNA possuir carga negativa em valores de pH neutro ou alcalino e consequentemente, quando aplicado ou imerso em uma matriz de gel submetida a um campo elétrico, migra em direção ao pólo positivo (ânodo). A velocidade da migração depende do tamanho da molécula. Por isso em um dado momento da eletroforese moléculas de tamanhos distintos se encontram em diferentes pontos da matriz.

O tipo de matriz que é usada (agarose ou poliacrilamida) depende do tamanho dos fragmentos de DNA que se pretende separar e visualizar. Devido à diferença no tamanho dos poros dessas matrizes, utiliza-se normalmente o gel de agarose para a separação de fragmentos que variam de 0,2 kb a 50 kb (1 kb = 1000 pares de bases) e o gel de poliacrilamida para separação de fragmentos pequenos, de até 1kb. Alternativamente para a resolução de fragmentos superiores a 1 kb pode-se utilizar a agarose com baixo ponto de fusão (*Low Melting*) que é um tipo de agarose derivada de síntese orgânica.

Apesar de ser mais efetivo para separar fragmentos pequenos, o gel de poliacrilamida apresenta algumas desvantagens. Entre elas, destaca-se o fato da poliacrilamida em solução, isto é, quando não polimerizada, ser neurotóxica. Assim, a preparação do gel exige certa cautela. Além disso, a preparação é mais laboriosa, requerendo a mistura

de componentes adicionais à poliacrilamida para ajudar na polimerização e mais tempo para que a polimerização ocorra propriamente.

Já o gel de agarose é feito apenas através da mistura de um tampão e agarose, não apresentando toxicidade. A polimerização é mais rápida e o gel pode ser reciclado após o uso, isto é, pode ser reutilizado na elaboração de outros géis. Além disso, a eletroforese em gel de agarose pode ser usada como método analítico ou preparativo, isto é, quando o fragmento de DNA é recuperado e purificado a partir do gel.

Entretanto, dependendo do método utilizado para a visualização do DNA, o gel de agarose pode ser desvantajoso. Frequentemente se utiliza a coloração com brometo de etídio (EtBr), uma substância mutagênica. Em adição, para a visualização do DNA corado com EtBr, é necessária a utilização de transiluminador de luz ultravioleta. Para a utilização de tal aparelho e para a o uso do brometo de etídio, é necessário o cuidado com a biossegurança não somente do manipulador, mas de todos os que compartilham o uso do laboratório.

Se houver a necessidade de separar fragmentos maiores do que 50 kb é necessário utilizar a eletroforese em campo pulsado (*pulse-field gel electrophoresis* – PFGE), que consiste, simplificada, de um gel submetido a uma corrente elétrica que se alterna em direções perpendiculares.

A seguir serão discutidas as quatro etapas necessárias para a realização da eletroforese em gel de agarose, a saber: preparação do gel, aplicação das amostras, corrida eletroforética e a análise e o registro dos resultados.

Preparação do gel:

A agarose, um polissacarídeo extraído de uma alga marinha vermelha e formado por resíduos de D e L galactose unidos por ligações glicosídicas α (1→3) e β (1→4), é um material gelatinoso e semelhante a gelatina incolor. Por isso, para se preparar um gel de agarose procede-se

de modo similar a preparação de uma gelatina. Dissolve-se uma quantidade em gramas do pó de agarose, ajustando-se a concentração apropriada para separar os fragmentos de DNA presentes na amostra (**Tabela 20.1**), em um dado volume de tampão de eletroforese. Os dois tipos de tampão mais utilizados são TAE (Tris-acetato-EDTA) e TBE (Tris-borato-EDTA).

Aquece-se a mistura em forno microondas ou utilizando um bico de *bunsen*, até que a solução fique homogênea e transparente. Aguarda-se a diminuição da temperatura até aproximadamente 50°C e verte-se em uma forma (um tipo de molde específico para o preparo do gel).

Tabela 20.1: Concentrações de agarose indicadas para a resolução dos fragmentos de DNA.

Concentração de agarose (% [w/v])	Faixa de tamanho dos fragmentos de DNA eficientemente separados (kb)
1,0	0,5 – 10,0
1,2	0,4 – 6,0
1,5	0,2 – 3,0
2,0	0,1 – 2,0

Adaptado de Sambrook e Russel (2001).

Sobre a solução ainda morna coloca-se um pente (uma tira de teflon denteada que ficará a 1 mm acima do fundo da forma) que servirá como molde para produzir diversas cavidades (poços) no gel. Essas minúsculas cavidades não chegam a atravessar o gel e servirão como reservatórios onde as amostras de DNA serão aplicadas. Ao esfriar e polimerizar, a agarose fica com o aspecto turvo e com resistência diretamente proporcional à concentração de agarose utilizada.

A seguir, a forma contendo o gel é colocada no interior da cuba de eletroforese horizontal (Figura 20.1). Na cuba o gel encontra-se entre fios de platina que atuam como cátodo e ânodo provocando a passagem de corrente elétrica gerada por uma fonte de eletricidade. Adiciona-se o mesmo tampão usado para fundir a agarose em quantidade suficiente para que o gel fique totalmente imerso tomando-se o cuidado para que o nível de tampão fique pelo menos 1 mm acima do gel. A seguir retira-se cuidadosamente o pente.

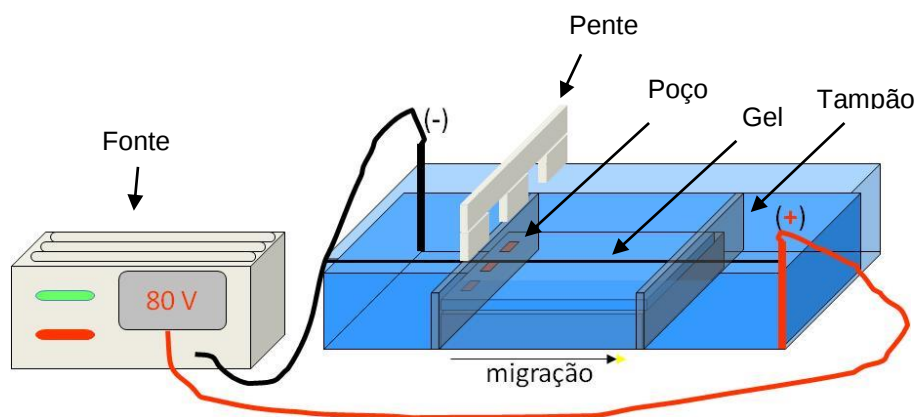


Figura 20.1: Representação esquemática dos equipamentos necessários para a realização da eletroforese em sistema horizontal (cortesia de Adriana Medaglia).

Aplicação das amostras:

Antes da aplicação, as amostras de DNA deverão ser misturadas a um tampão de amostra. O tampão de amostra contém corantes e reagentes de alta densidade (sacarose, glicerol ou ficol). Estes últimos asseguram que a amostra de DNA entre no poço pela força da gravidade. Já os corantes, azul de bromofenol e o xileno cianol, facilitam a aplicação da amostra no gel (acrescentam cor na amostra) e auxiliam no monitoramento da corrida, já que apresentam velocidade conhecida durante a migração na matriz em direção ao pólo positivo. Por exemplo, o

azul de bromofenol migra juntamente com um fragmento de DNA de aproximadamente 0,3kb e o xileno cianol com um fragmento de 4 kb em géis de agarose de 0,5 a 1,4% em TAE. Há ainda corantes que migram mais rapidamente, como o Amarelo G, que acompanha fragmentos menores que 100pb. Estes corantes podem ser adicionados simultaneamente no tampão de amostra, ou utilizados individualmente, dependendo da disponibilidade e objetivo do experimento.

Para permitir uma estimativa visual do tamanho dos fragmentos de DNA de uma dada amostra é necessário aplicar em um dos poços o marcador de massa molecular (*ladder*). O *ladder* é uma mistura de diversos fragmentos de DNA de tamanhos e concentrações conhecidos, gerados a partir da digestão de plasmídeos (tipo de DNA circular presente em bactérias) com enzimas de restrição. Ele permite inferir, por comparação, o tamanho dos fragmentos presentes na amostra analisada.

Existem no mercado diversos tipos de *ladders*, que variam no tamanho dos fragmentos de DNA presentes na solução. Dentre os mais utilizados, destacam-se os marcadores *Ladder* 1kb, que contém 13 fragmentos que vão de 0,3 a aproximadamente 10 kb; e o *Ladder* 100bp que contém 14 fragmentos que variam de 0,1 a 5 kb, com duas bandas de alta intensidade em 1,5 e 2 kb.

Corrida de eletroforese:

Após a aplicação das amostras, encaixa-se a tampa da cuba contendo os cabos que permitirão a conexão entre a cuba e a fonte de corrente contínua.

Para se determinar a voltagem que será utilizada deve-se computar a distância entre os eletrodos e não o comprimento do gel. Geralmente usa-se uma voltagem de 1 a 5 V/cm. Voltagens excessivas ou muito baixas interferem na mobilidade do DNA e causam distorções na migração. Para cubas rotineiramente utilizadas pela maioria dos laboratórios de pesquisa, a voltagem varia entre 50 e 110 V.

Durante a corrida o DNA sairá do poço, penetrará no gel, migrando em direção ao pólo positivo. Com isso os fragmentos serão separados de acordo com o tamanho. Os fragmentos menores migram mais rapidamente que os fragmentos maiores, pois eles apresentam maior facilidade de atravessar os poros da matriz de agarose em direção ao pólo positivo. Enquanto que fragmentos de mesmo tamanho migram praticamente juntos.

No caso da utilização do azul de bromofenol, quando este atingir $\frac{3}{4}$ do gel a corrente pode ser desligada. Entretanto, há variações de acordo com o tamanho do fragmento de DNA de interesse. Se o fragmento for muito grande, aguarda-se a separação dos fragmentos maiores na parte superior do gel e não há tanta preocupação com a parte inferior. Neste caso, o corante pode até sair do gel.

Análise e registro dos resultados:

O método mais usual para se visualizar o DNA em géis de agarose é por coloração com brometo de etídeo (EtBr) de fórmula $C_{21}H_{20}BrN_3$. Esse corante se intercala entre as bases dos ácidos nucleicos e, na presença de luz Ultra Violeta (entre 260 e 360nm), fluoresce em vermelho alaranjado (590nm). Com este método pode-se detectar uma quantidade igual ou maior que 10 ng de DNA e a intensidade de fluorescência emitida é proporcional à concentração de DNA presente na amostra. O brometo de etídeo pode ser utilizado de 3 diferentes formas: aplicado diretamente no gel (uso mais frequente), no tampão da amostra a ser aplicada, ou após a corrida quando o gel é submergido em solução de EtBr.

No entanto, não é recomendada a incorporação do brometo de etídeo no gel porque esse corante interfere no padrão de migração das diversas conformações que a molécula de DNA pode assumir. Segundo, e não menos importante, devido à contaminação da vidraria, da cuba e demais utensílios usados na preparação do gel.

Corantes fluorescentes atóxicos são boas opções alternativas (Yung-Sharp e Kumar, 1989) para visualizar o DNA. Alguns exemplos disponíveis no mercado são: o Azul de Metileno (Flores, et al, 1992), que não apresenta potencial mutagênico e não requer luz U.V, embora apresente a desvantagem de ser pouco sensível; o Sybr Safe®, um corante fluorescente que cora o DNA no gel de agarose e no gel de poliacrilamida exibindo a mesma sensibilidade que o brometo de etídeo e visualizado no transiluminador de luz azul; e o *GelRed* e o *GelGreen* que pelo fato de serem termoestáveis podem ser adicionados antes da homogenização do gel.

Os grupos de moléculas de mesmo tamanho que migram na matriz de agarose assumem a forma do poço e constituem as formas chamadas de bandas de DNA. Após a visualização os resultados geralmente são fotodocumentados. No caso de géis corados com brometo de etídio, as fotos devem ser adquiridas sob luz ultravioleta. Para tal, utiliza-se filme *Polaroid* (branco e preto) ou um software capaz de transformar em imagem a intensidade relativa de fluorescência emitida pelas bandas de DNA captadas por uma câmera fotográfica digital. Em alguns laboratórios, a fim de minimizar os potenciais efeitos danosos da luz ultravioleta, o gel corado com brometo de etídio é colocado dentro de uma câmara e a luz U.V só é ligada com a câmara fechada. Uma câmera acoplada registra a foto do gel.

Fatores que influenciam a migração do DNA:

A mobilidade eletroforética do DNA através do gel de agarose é influenciada por vários fatores que serão discutidos a seguir.

a- Tamanho e conformação do DNA

O tamanho dos fragmentos de DNA é o principal fator que influencia a migração em gel de agarose. Pode-se dizer que este seria o fator crítico e alvo da análise.

Uma molécula de DNA migra na matriz de agarose com mobilidade inversamente proporcional ao $\log_{10}$ de sua massa molecular, que, por sua vez, é função do tamanho e da forma da molécula. Assim, o tamanho do fragmento do DNA em pares de base, ou seja, sua sequência linear, é o fator que, em princípio, deveria influenciar a migração no gel. Entretanto, nem sempre o DNA encontra-se linear e descondensado e tais fatores podem alterar a migração do fragmento no gel, pois interferem na passagem da molécula de DNA pelos poros.

As moléculas de DNA circular podem assumir formas como: relaxada (com corte, isto é, *nick*) ou superenovelada (*supercoiled*). Estas formas não migram de acordo com o tamanho do DNA durante a eletroforese, podendo atravessar a malha do gel em velocidades superiores ou inferiores ao padrão.

No entanto, quando estas moléculas circulares são linearizadas, ou seja são clivadas em um ponto e assumem uma forma linear, então a corrida na eletroforese obedece ao tamanho da molécula. Sob algumas condições, a forma circular superenovada migra mais rapidamente que a forma linear; e sob outras condições acontece o inverso.

Outro exemplo é o DNA genômico, pois sua estrutura condensada e complexa não permite que os fragmentos migrem de acordo com o tamanho em pares de base e sim, fiquem presos nos poros do gel devido à sua estrutura densa e irregular que não permite que os fragmentos atravessem.

Assim, a mobilidade das formas do DNA no gel não depende somente do tamanho da molécula, mas da densidade, torção do DNA e de outros fatores que serão discutidos a seguir.

b- Concentração de agarose

A concentração da agarose desempenha papel importante na separação eletroforética, pois determina a porosidade do gel, que por sua vez, influencia diretamente na capacidade de migração das moléculas de DNA. Portanto, o tamanho dos poros desta matriz é inversamente proporcional à concentração de agarose utilizada e diretamente proporcional ao tamanho dos fragmentos de DNA que se deseja separar.

Vale ressaltar que a agarose, apesar de apresentar um custo elevado, pode ser reciclada e reutilizada em eletroforese analítica. Para isso é necessário descontaminá-la dos resíduos de brometo de etídio, equilibrá-la em água, desidratá-la e transformá-la novamente em pó (Reiniger et al, 2004).

c- Presença do brometo de etídeo no gel

A mobilidade dos fragmentos de DNA é influenciada pela presença do brometo de etídeo. O fato desse agente se intercalar entre os pares de bases provoca mudanças na conformação e na flexibilidade da molécula de DNA. Na ausência de brometo as moléculas circulares superenoveladas (forma I) migram mais rápido do que as moléculas lineares (forma III) de mesma massa molecular. Já as moléculas circulares relaxadas (forma II) migram mais lentamente do que as outras duas isoformas topológicas.

Na presença de EtBr os superenovelamentos negativos (geralmente encontrados no DNA de procarioto) são gradualmente removidos, causando a diminuição na mobilidade do DNA. Porém, altas concentrações de brometo acarretam na formação de superenovelamento positivo e conseqüente aumento da mobilidade das moléculas. Além disso, a corrida da forma linear é reduzida em cerca de 15% quando comparada a migração da mesma molécula na ausência do agente intercalante.

Assim, dependendo do objetivo do experimento o uso de altas concentrações do brometo de etídeo é uma estratégia que permite separar a forma circular superenovelada das formas circular relaxada e linear.

d- Voltagem e tipo de tampão de eletroforese aplicada

A corrente elétrica, a composição e a força iônica do tampão influenciam na migração do DNA. Em uma faixa de baixa voltagem, a taxa de migração de fragmentos de DNA linear é proporcional à voltagem aplicada. Entretanto, o aumento de voltagem faz com que a linearidade seja perdida. Desta forma, os grandes fragmentos de DNA migram mais rápido do que os pequenos havendo formação de “rastros” que refletem a má resolução dos fragmentos.

Em baixa força iônica, a migração é lenta e em alta força iônica há uma super condutividade elétrica que gera calor e pode derreter o gel dentro da cuba além de desnaturar o DNA.

Os tampões mais utilizados em eletroforese de DNA são o TAE (Tris-acetato-EDTA) e o TBE (Tris-borato-EDTA), ambos compostos pelo elemento tamponante, o Tris ou (hidroximetil) aminometano. Ressalta-se que o Acetato (ácido acético) ou Borato (ácido bórico) são utilizados para ajustar o valor de pH da solução e atuam como eletrólitos para a manutenção da corrente. Enquanto que o EDTA (ácido etienodiamino tetracético) presente em ambos os tampões serve como um agente quelante que sequestra íons de magnésio entre outros. Isto é particularmente interessante para proteger o DNA via inibição de nucleases que dependem da presença de magnésio para degradar o DNA.

A seleção dos tampões de eletroforese TAE ou TBE depende do objetivo do experimento. O TAE possui a menor capacidade tamponante, no entanto, apresenta maior poder de resolução para moléculas grandes de DNA quando comparado ao TPE (Tris fosfato EDTA) ou TBE. Por sua vez o tampão TBE é preferido para a separação de

moléculas pequenas de DNA, menores do que 1 kb, e para longas corridas devido a sua maior capacidade tamponante. No caso do DNA ser posteriormente recuperado do gel e utilizado, por exemplo, em um experimento de clonagem, prefere-se o uso de TAE, pois o Borato presente no TBE é um potente inibidor de várias enzimas.

Interpretando o resultado de uma eletroforese em gel de agarose no diagnóstico da anemia falciforme

Uma das análises que pode ser feita por eletroforese em gel de agarose é o diagnóstico da mutação que deu origem à Anemia Falciforme. Esta mutação pontual no gene da globina beta da hemoglobina (substituição de uma Adenina por uma Timina na 20ª posição da sequência de nucleotídeos) elimina o ponto de restrição da enzima *Dde* I.

É necessário lembrar que a visualização do DNA através da eletroforese é o último passo que é realizado para a análise em questão. Assim as etapas que precedem a eletroforese são:

- a- Extração do DNA genômico.
- b- Amplificação de uma região de 381 pb do gene da beta globina que contém a região da mutação.
- c- Incubação com a enzima de restrição *Dde* I que reconhece o sítio C/TNAG (N = qualquer um dos quatros nucleotídeos).

Como resultado são gerados perfis de fragmentos de DNA que permitem o reconhecimento do genótipo homozigoto normal ($\beta^A \beta^A$), do heterozigoto e do homozigoto carregando cópias do alelo mutado ($\beta^A \beta^S$ e $\beta^S \beta^S$). Em outras palavras, o fragmento de DNA contendo 1 sítio de restrição resultará em 2 novos fragmentos devido à clivagem. Já na presença da mutação a enzima não reconhecerá o sítio de restrição e não cortará o fragmento (Figura 20.2).

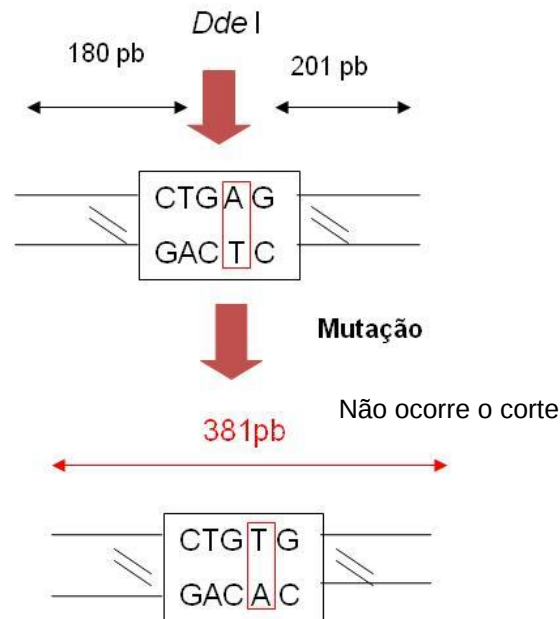


Figura 20.2: Uso da enzima de restrição *Dde* I no diagnóstico da Anemia Falciforme. Observar que a substituição da adenina pela timina elimina o sítio de clivagem da enzima.

Assim, o indivíduo homozigoto para o alelo normal apresentará duas bandas no gel de agarose, devido à clivagem do gene pela enzima *Dde* I. O indivíduo homozigoto para o alelo mutante, por outro lado, apresentará apenas uma banda correspondente ao fragmento não clivado por *Dde* I devido à presença da mutação. Finalmente, o indivíduo heterozigoto, isto é, que carrega um alelo normal e um alelo mutante, apresentará três bandas no gel: uma correspondente ao alelo mutado não clivado, e duas correspondentes ao alelo normal clivado (Figura 20.3).

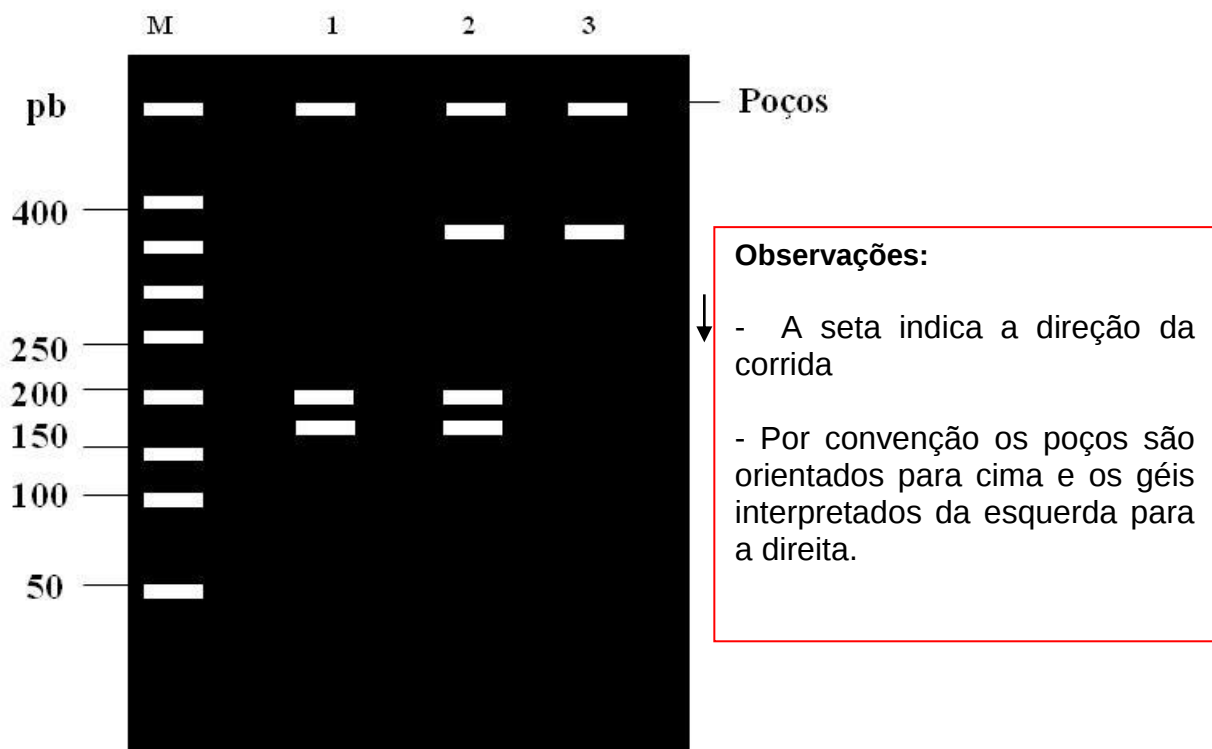


Figura 20.3: Análise de restrição do produto amplificado de 381pb do gene da β -globina. Representação esquemática de um gel de agarose mostrando em (M) marcador de massa molecular; (1) indivíduo homozigoto dominante para o alelo normal (presença de dois fragmentos um de 201pb e o outro de 180pb); (2) indivíduo heterozigoto (alelo normal = banda de 201pb e 180pb; e o alelo mutado = banda de 381pb); (3) indivíduo homozigoto recessivo (ambos os alelos carregam a mutação que elimina o sítio de restrição (banda de 381pb).

ANEXO

Composição do tampão de eletroforese para DNA (concentração da solução estoque por litro). Adaptado de Sambrook e Russel (2001).

TAE 50X

242 g de Tris Base
57,1 mL de ácido acético glacial
100 mL de 0,5 M EDTA* (pH 8,0). *Ajustar o pH da solução de EDTA com NaOH
Armazenar a temperatura ambiente

TBE 10 X

107,8g de Tris base
7,44 g de EDTA (Na₂EDTA.2H₂O)
Aproximadamente 55,0 g de ácido bórico anidro
Adicionar lentamente o ácido bórico até alcançar o valor de pH igual a 8,3
Armazenar a temperatura ambiente

TPE 10X

40 mL de EDTA 0,5 M (pH 8,0)
15,5 mL ácido fosfórico 85 %
108 g de Tris Base
Armazenar a temperatura ambiente

Composição do tampão da amostra para DNA (*loading buffer* 6X):
Adaptado de Sambrook e Russel (2001).

Azul de bromofenol 0,25%
Xileno cianol FF 0,25%
Glicerol 30%
Armazenar em aliquotas de 1 mL à 4°C

Referências Bibliográficas

Flores, N. et al. Recovery of DNA from agarose gels stained with methylene blue. **Biotechniques**, n. 13, p. 203-205, 1992.

Reiniger et al. Reciclagem de agarose em laboratórios de biologia molecular. **Ciência Rural**, v. 34, n.5, set-out, 2004.

SAMBROOK. J.; RUSSEL, D. W. **Molecular Cloning**: A Laboratory Manual. 3.ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 2001.

Yung-Sharp, D; Kumar, R. Protocols for the visualisation of DNA in electrophoretic gels by a safe and inexpensive alternative to ethidium bromide. **Technique**, v. 1, n **3**, p. 183-187, 1989.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS CITADAS NOS CAPÍTULOS 1 A 17.

BEZERRA, A.C.; ALBUQUERQUE, D.M.; SANTOS, M.N.N. *et al* – Two new unstable haemoglobins leading to chronic haemolytic anaemia: Hb Caruaru (Beta 122 Phe-Ser), a probable case of germ line mutation, and Hb Olinda (Beta 22-25) deletion of a 12 base-pair sequence. **European Journal of Haematology** 82-8: 1-5 (Case Report), 2009.

COOLEY, T.B.; LEE, P. – A series cases of splenomegaly in children with anemia and peculiar changes in bone. **Trans. Am. Pediatr. Soc.** 37: 29-35, 1925.

FLEURY, M.K. – Determinação dos haplótipos do grupamento do gene da globina beta em pacientes com anemia falciforme no Rio de Janeiro. **Tese de Doutorado apresentada a Universidade Federal do Rio de Janeiro**, Centro de Ciências da Saúde, Instituto de Biologia, Rio de Janeiro, 2000.

GRABAR, P.; WILLIAMS, C.A. – Method permitting the study of the electrophoretic and immunochemical properties of a group of proteins. Application to the blood serum. **Biochem. Biophys. Acta** 10:103-104, 1953.

GRAHAM, J.L.; GRUNBAUN, B.W. – A rapid method for microelectrophoresis and quantitation of hemoglobin in cellulose acetate. **Am. J. Clin. Pathol.** 44:695-701, 1963.

GRIMES, A.J.; MEISTER, A.; DACIE, J.V. – Congenital Heinz – body anaemia. Further evidence on the cause of Heinz-body production in red cells. **Brit. J. Haematol.** 31:1099-1103, 1964.

HERRICK, J.B. – Peculiar elongated and sickle-shaped red blood corpuscles in a case of severe anemia. **Arch. Int. Med.** 6: 517–521, 1910.

HUNT, J. A.; INGRAM, V. – Abnormal human haemoglobins. II. The Chymotryptic digestion of the trypsin-resistant core of haemoglobin A and S. **Bioch. Biophys. Acta** 28: 539–540, 1958.

INGRAM, V. – A specific chemical difference between globins of normal and sickle cell anaemia haemoglobins. **Nature** 178: 792–794, 1956.

ITANO, H. A.; NEEL, J. V. – A new inherited abnormality of human hemoglobin. **Proc. Nat. Acad. Sci.** 36: 613–617, 1950.

JORGENSEN, J. W.; LUCKAS, K. D. – Zone electrophoresis in open – tubular glass capillaries. **Anal. Chem.** 53: 1292–1302, 1981.

KAN, Y.W.; DOZY, A.M. – Polymorphism of the DNA sequence adjacent to beta globin structural gene: relationship to sickle mutation. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 75: 5671–5675, 1978.

KAN, Y.W.; DOZY, A.M. – Evolution of the hemoglobins S and C genes in world populations. **Science** 209: 388–391, 1980.

KOHN, J. – Cellulose acetate electrophoresis and immunodiffusion techniques. **Chromatographic and Electrophoresis Technics**. Edited by William Heineman, Medical Books, London, 1958.

LAUER, H.H.; Mc MANIGILL, D.M. – Physico-chemical characterization of protein by capillary electrophoresis. **Anal. Chem.** 58: 166–170, 1986.

LEHMANN, H.; HUNTSMAN, R.G. – Man's haemoglobins. North-Holland Publishing Company, Amsterdam, 1974.

PAULING, L.; ITANO, H.; SINGER, S.J.; WELLS, I.C. – Sickle anemia, a molecular disease. **Science** 110: 543–548, 1949.

RAYMOND, S.; WEINTRAUB, L. – Acrylamide gel as a supporting medium for zone electrophoresis. **Science** 130: 711, 1959.

SILVESTRONI, E.; BIANCO, J. – La malattia microdrepanocítica. Il Pensiero Scientifico Editore, Roma, 1954.

TISELIUS, A. – Electrophoresis of serum globulin. II. Electrophoretic analysis of normal and immune sera. **Biochem. J.** 31: 1464–1477, 1937.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS CONSULTADAS PARA ESCREVER OS CAPÍTULOS 1 A 17

ANDREWS, A.T. – Electrophoresis – **Theory, techniques and biochemical and clinical applications.** Oxford Science Publications, Oxford, 2nd edition, 1986.

BAIN, B.J. – Haemoglobinopathy diagnosis. Blackwell Science Ltd, Oxford, 2001.

CHAMARY, J.V.; HURST, L.D. – The price of silent mutations. **Scientific American**, June 2009: 34–41.

DARBY, N.J.; CREIGHTON, T.E. – **Protein structure.** IRL Press, Oxford, 1995.

FAUCHIER, P.; CATALAN, F. – **Interpretative guide to clinical electrophoresis**. Helena Laboratories, 2nd edition, Paris, 1988.

GARG, A. – Management of dyslipidemia in IDDM patients. **Diabetes Care** 17: 224–234, 1994.

GARG, A. – Dyslipoproteinemia and diabetes. **Endocrinol Metabol Clin North Am** 17: 224–234, 1998.

GIORDANO, P.C. – **Carrier diagnostics and prevention of hemoglobinopathies using capillary electrophoresis**. Laboratories SEBIA, Lisses, 2007.

HARWOOD, R. – **Biochemistry**. Cambridge University Press, Cambridge, 2002.

HUGHES, J.; JEFFERSON, A. – **Clinical chemistry**. Churchill Livingstone Publishers, Edinburgh, 2008.

LAUER, H.H.; OOMS, J.B. – Advanced in capillary electrophoresis: the chalanges to liquid chromatography and conventional electrophoresis. **Anal Chem Acta**. 250: 45–60, 1991.

MARENGO – ROWE, A.J. – Rapid electrophoresis and quantitation of hemoglobin on cellulose acetate. **J Clin Pathol** 18: 790–792, 1965.

NAOUM, P.C. – **Hemoglobinopatias e talassemias**. Editora Sarvier de Livros Médicos, São Paulo, 1997.

NAOUM, P.C. – **Eletroforese. Técnicas e Diagnósticos**. Livraria Santos Editora Ltda., São Paulo, 2ª ed., 1999.

NAOUM, P.C.; NAOUM, F.A. - **Doença das células falciformes**. Editora Sarvier de Livros Médicos, São Paulo, 2004.

NAOUM, P.C. - **Doenças que alteram os exames bioquímicos**. Editora Atheneu, Rio de Janeiro, 2008.

PROVAN, D.; GRIBBEN, J. - **Molecular haematology**. Blackwell Science Ltda., Oxford, 2000.

RODGERS, G.P. - **Sickle cell disease and thalassaemia**. Tindall Publishers, London, 1998.

STEIBERG, M.H.; FORGET, B.C.; HIGGS, D.R.; NAGEL, R.L. - **Disorders of Hemoglobin**. Cambridge University Press, Cambridge, 2001.

STIX, G. - Traces of a distant past. **Scientific American**, July 2008: pg 38-45.

VELLA, F. - Acid agar-gel electrophoresis of human hemoglobin. **Am J Pathol** 49: 440-442, 1968.

WALDESTRON, J.G. - **Monoclonal and polyclonal hypergammaglobulinemia**. Cambridge University Press, Cambridge, 1968.

WEATHERALL, D.J.; PROVAN, A.B. - Red cells and inherited anaemias. **Lancet** 355: 1169-1175, 2000.

YEUNG, E.S.; KUHR, W.G. - Indirect detection methods for capillary separations. **Anal Chem** 63: 275-282, 1991.

GLOSSÁRIO

Ácidos biliares – São ácidos esteróides encontrados na bile. Os ácidos biliares produzidos pelo fígado atuam diretamente sobre as gorduras como detergentes, facilitando a ação de enzimas que as transformarão em ácidos graxos e colesterol.

Apoproteínas – É um termo químico que se refere à porção protéica em qualquer proteína conjugada. Numa concepção mais específica, o termo apoproteína é usado para indicar a porção protéica de uma lipoproteína. A apoproteína é denominada em clínica médica por apolipoproteína.

Arne Tiselius – Arne Wilhelm Kaurin Tiselius, bioquímico sueco (Uppsala, 1902 – 1971), foi laureado com o Prêmio Nobel de Química em 1958 por suas pesquisas em eletroforese e análise de adsorção das proteínas séricas.

Densitômetro – É um equipamento usado para quantificar frações separadas eletroforéticamente. O suporte de separação eletroforética, ou meio de separação, notadamente géis de agarose e poliacrilamida e acetato de celulose transparentizado, é colocado numa base móvel que se desloca num determinado sentido. Ao se deslocar, a base com o suporte de separação passa sobre um orifício através do qual há a transmissão de luz com determinado espectro (filtro verde, azul ou vermelho). A luz ao atingir a fração corada, atravessa-a com maior ou menor intensidade, conforme a densidade de sua concentração. A luz que atravessa a fração é captada por uma célula foto elétrica que registra o seu grau de intensidade, transformando-o em valor percentual. Atualmente esse mesmo processo pode ser feito em “scanner” programado com “software” para esse fim, facilitando e tornando economicamente acessível o uso da densitometria eletroforética.

Eletroendosmose – É um processo físico-químico que ocorre com significativa intensidade em eletroforese em ágar ou agarose. Pelo fato do ágar não ser uma substância totalmente neutra, os íons do tampão reagem com receptores elétricos do ágar e produz um movimento elétrico de baixa intensidade na direção oposta ao do sentido da eletroforese. Quando o ágar tem bom grau de pureza, a eletroendosmose não interfere na corrida eletroforética. Porém, em ágar com baixo grau de pureza a eletroendosmose adquire significativo grau de condutividade que, além de retardar o fracionamento eletroforético, provoca excessivo calor (dispêndio termodinâmico) que pode, inclusive, derreter o gel de ágar.

Francis Harry Compton Crick – Bioquímico inglês (Weston Favell, 1916 – 2004) que juntamente com James Watson e Maurice Wilkins idealizaram o modelo de dupla hélice da molécula de DNA, cujo trabalho foi publicado em 1953 na revista científica Nature. Por esta descoberta, recebeu, juntamente com seus dois colegas, o Prêmio Nobel de Fisiologia/Medicina de 1962.

Hormônios Esteróides – Esses hormônios são classificados em dois grandes grupos: os corticosteróides e os esteróides sexuais. Os corticosteróides são subdivididos em mineralocorticóides (progesterona, aldosterona e corticosterona) e glicocorticóides (ex.: cortisol e cortisona). Os esteróides sexuais são subdivididos em andrógenos (ex.: testosterona, DHEA e androstenediona) e estrogênios (ex.: estrona e estriol).

Imunoeletroforese – É um processo físico, químico e biológico em que se combinam eletroforese em ágar e difusão de anticorpos específicos e conhecidos. Inicialmente se faz a eletroforese das proteínas séricas para fracioná-las. Ao término da eletroforese, as proteínas fracionadas são precipitadas com ácido acético ou tricloroacético. A seguir, se faz um sulco longitudinal no sentido da eletroforese, distante um centímetro de distância ao longo das frações. Nesse sulco se aplica o anti-soro contendo

os anticorpos específicos contra albumina e globulinas. A difusão desses anticorpos se processa por doze horas, em geral, ao fim do qual se fixam com ácido acético ou ácido tricloroacético e, a seguir, as linhas de precipitação são coradas com corantes para eletroforeses.

James Dewey Watson – Biólogo americano (Chicago, 1928 –) que juntamente com Francis Crick e Maurice Wilkins idealizaram o modelo de dupla hélice da molécula de DNA, cujo trabalho foi publicado em 1953 na revista científica Nature. Por esta descoberta, recebeu juntamente com seus dois colegas, o Prêmio Nobel de Fisiologia/Medicina de 1962.

Kendrew - John Cowdery Kendrew, químico inglês (Oxford, 1917 – 1997). Trabalhou como pesquisador na Universidade de Cambridge, Inglaterra, desde 1936, onde formou juntamente com o seu colega Max Perutz o laboratório de Biologia Molecular daquela universidade. Foi laureado com o Prêmio Nobel de Química em 1962, juntamente com Perutz, pelo estudo da estrutura da hemoglobina e outras proteínas globulares.

Lei de Stokes – Refere-se à força fricção ou de atritamento que ocorre entre objetos esféricos, que se movem no interior de um fluido viscoso em regime laminar. Foi proposta em 1851 pelo físico George Gabriel Stokes, que considerou quatro bases para a sua formação: (F) força de fricção; (r) raio da partícula; (n) viscosidade do fluido; (v) velocidade da partícula. Desse conjunto de considerações, Stokes sugeriu a seguinte fórmula para avaliar a migração de partículas esféricas pequenas num campo elétrico:

$$\vec{F} = - 6 \pi r n \vec{v}$$

Linus Pauling – Linus Carl Pauling, químico americano (Portland, 1901 – 1994), é reconhecidamente um dos principais químicos do século 20. Foi pioneiro na aplicação de mecânica quântica em química e o primeiro

cientista a descrever em 1949 o fracionamento eletroforético da Hb S, hemoglobina anormal da doença falciforme. Em 1954 foi laureado com o Prêmio Nobel de Química pelo seu trabalho sobre a natureza das ligações químicas. Em 1962 foi outra vez premiado com o Prêmio Nobel da Paz pela sua campanha contra os testes nucleares.

Micelas – São estruturas globulares formadas por agregados de moléculas surfactantes, ou seja, com características polares e apolares simultaneamente, e que se encontram dispersas em líquidos coloidais.

Max Perutz – Max Ferdinand Perutz, biólogo molecular de origem austríaca (Viena, 1914 – 2002). Trabalhou como pesquisador na Universidade de Cambridge, Inglaterra, desde 1936, onde formou juntamente com seu colega John Kendrew, o laboratório de Biologia Molecular daquela universidade. Foi laureado com o Prêmio Nobel de Química em 1962, juntamente com Kendrew, pelo estudo da hemoglobina e outras proteínas globulares.

Potencial Zeta – É a representação numérica que descreve a intensidade do campo elétrico estático que existe entre as camadas elétricas carregadas positiva e negativamente, dispostas nas superfícies das moléculas que estão num mesmo meio.