



## **Variantes da hemoglobina com mobilidade eletroforética semelhante à da hemoglobina S**

### *Hemoglobin variants with electrophoretic behavior similar to hemoglobin S*

Armandina Miranda<sup>1</sup>, Filomena Seuanes<sup>1</sup>, Sandra Copeto<sup>1</sup>, Pedro Loureiro<sup>2</sup>, Isabel Picanço<sup>1</sup>, Alcina Costa<sup>1</sup>, Sandra Costa<sup>1</sup>, Maria Teresa Seixas<sup>1</sup>, João Gonçalves<sup>2-4</sup>, Paula Faustino<sup>4,5</sup>

[armandina.miranda@insa.min-saude.pt](mailto:armandina.miranda@insa.min-saude.pt)

(1) Unidade Laboratorial de Referência. Departamento de Promoção da Saúde e Prevenção de Doenças Não Transmissíveis, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal

(2) Unidade de Genética Molecular. Departamento de Genética Humana, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal.

(3) Centro de Toxicogenómica e Saúde Humana. Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, Portugal.

(4) Unidade de Investigação e Desenvolvimento. Departamento de Genética Humana, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal.

(5) Instituto de Saúde Ambiental. Faculdade de Medicina, Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal

### **\_Resumo**

As hemoglobinopatias são doenças genéticas relacionadas com défice da hemoglobina, a proteína vital para o transporte de oxigénio no organismo. De entre elas salienta-se a Drepanocitose causada pela variante S da hemoglobina (HbS) em homozigotia. Neste estudo pretendeu-se identificar as variantes de hemoglobina cujo padrão de migração eletroforética é semelhante ao da HbS. Foram investigados 660 casos de variantes com as características acima referidas detetadas por focagem isoelétrica. Para a identificação presumtiva foi efetuado o teste de solubilidade e a caracterização por HPLC de troca iónica e de fase reversa. A identificação das variantes raras foi efetuada através de sequenciação de Sanger do respetivo gene globínico. De entre os casos estudados, 467 foram confirmados como sendo HbS (70,8%), 101 HbD (15,3%) e 74 HbLepore (11,2%). Os restantes 18 casos (2,7%) foram classificados como variantes raras tendo sido 11 identificadas por sequenciação de DNA. Concluímos que a combinação metodológica utilizada é adequada pois permitiu o correto diagnóstico das variantes mais frequentes e com relevância clínica (HbS, HbD e HbLepore) e, nos casos raros, direcionou o estudo molecular para a análise do gene globínico alterado. A correta identificação de cada variante é essencial para um adequado acompanhamento clínico e aconselhamento genético do doente e seus familiares.

### **\_Abstract**

*Hemoglobinopathies are genetic diseases related to hemoglobin deficiency, the vital protein for the transport of oxygen in the body. Among them, the most significant is Sickle Cell Anemia caused by homozygosity for the hemoglobin variant S (HbS). The aim of this work was to identify hemoglobin variants with electrophoretic mobility similar to HbS. In this study we analysed 660 cases of variants with HbS-like mobility in isoelectric focusing. For the presumptive identification the solubility test was performed followed by ion-exchange HPLC and reversed phase-HPLC. The rare variants identification was performed by Sanger sequencing of the corresponding globin gene. Among the evaluated cases, 467 were confirmed as HbS (70.8%), 101 HbD (15.3%) and 74 HbLepore (11.2%). The remaining 18 cases (2.7%) were classified as rare variants and 11 of them were identified by DNA sequencing. We can conclude that the methodological combination used allows the correct diagnosis of the more*

*frequent and clinical relevant variants (HbS, HbD and HbLepore) and, in the other cases, helps to direct the molecular study for the analysis of the affected globin gene. The correct laboratorial diagnosis of each variant is essential for the adequate clinical follow-up and genetic counselling of the patients and their relatives.*

### **\_Introdução**

As hemoglobinopatias são um grupo heterogéneo de doenças hereditárias autossómicas recessivas, relacionadas com défice quantitativo ou qualitativo da hemoglobina, a proteína vital para o transporte de oxigénio no organismo. No primeiro grupo enquadram-se as talassémias e, no segundo, as variantes estruturais da hemoglobina. Estas são, geralmente, causadas por mutações nos genes globínicos que dão origem a substituição de um aminoácido na proteína e, conseqüentemente, alteram as propriedades físicas, químicas ou funcionais da molécula de hemoglobina.

Estão descritas atualmente mais de 1000 variantes de hemoglobina, mas a mais frequente em Portugal, e também a nível mundial, é a denominada hemoglobina S (HbS; *HBB:c.20A>T*) (1,2). O indivíduo portador de uma variante de hemoglobina (heterozigótico) é na maior parte das vezes assintomático. No entanto, a presença da variante em homozigotia ou em associação com um determinante genético de outra hemoglobinopatia poderá originar uma patologia grave. No caso da HbS, quando esta se apresenta em homozigotia causa Drepanocitose, uma anemia hemolítica crónica de elevada morbidade e mortalidade, embora clinicamente muito heterogénea.

As hemoglobinopatias são doenças genéticas em que a deteção de portadores é possível por testes hematológicos e bioquímicos pelo que a sua identificação é frequentemente presuntiva, com base em tempos de retenção e padrões de migração eletroforética das hemoglobinas. Uma vez que o perfil eletroforético da HbS é partilhado com outras variantes de hemoglobina com ponto isoelétrico semelhante, é imprescindível que sejam efetuados testes laboratoriais confirmatórios para a sua correta identificação. Essas variantes poderão ser fonte de confusão na interpretação dos resultados laboratoriais favorecendo falsos resultados positivos de HbS. Em determinadas situações poderá ser necessário o prosseguimento para a análise molecular do respetivo gene globínico para a identificação definitiva da variante em causa.

### \_Objetivos

Neste estudo pretendeu-se identificar as variantes de hemoglobina cujo padrão de migração é semelhante ao da HbS quando se usam os métodos comuns de diagnóstico laboratorial, eletroforese ou focagem isoelétrica. Pretende-se ainda sensibilizar os laboratórios que realizam rastreio de hemoglobinopatias para a importância da correta identificação deste tipo de variantes.

### \_Materiais e métodos

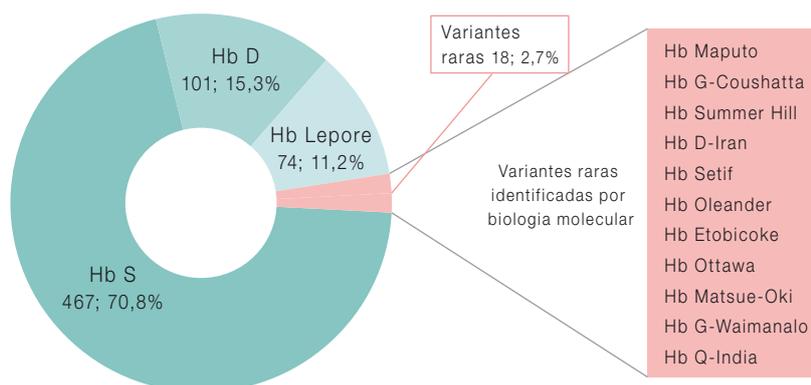
O diagnóstico laboratorial de 660 casos de variantes de hemoglobina foi efetuado na Unidade Laboratorial de Referência do Departamento de Promoção da Saúde e Prevenção de Doen-

ças Não Transmissíveis do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge com base na marcha analítica implementada, que faz uso de técnicas de primeira linha e técnicas de confirmação do diagnóstico (3,4). O procedimento iniciou-se com os testes de rastreio, o eritograma e a focagem isoelétrica (FI) em gel de poliacrilamida seguindo-se a cromatografia de HPLC de troca iónica. A HbS foi confirmada pelo teste de solubilidade (3,4). As cadeias de globina variantes foram caracterizadas segundo a sua hidrofobicidade, e classificadas em tipo alfa ou tipo beta, por cromatografia de fase reversa (RP-HPLC). A identificação definitiva das variantes de hemoglobina raras foi realizada usando metodologia convencional de genética molecular (PCR e sequenciação de Sanger).

### \_Resultados e discussão

Foram analisados, retrospectivamente, os casos de variantes de hemoglobina com mobilidade eletroforética semelhante à da HbS, estudados no laboratório no período compreendido entre janeiro de 2010 e agosto de 2017 (n=660). Os procedimentos analíticos utilizados seguiram as diretrizes internacionais (4) e foram baseados, no mínimo, em duas metodologias com princípios de separação de hemoglobinas diferentes, adequados para a deteção e identificação presuntiva das variantes de hemoglobina clinicamente mais significativas. Assim, dos 660 casos, 467 foram confirmados como sendo efetivamente HbS (70,8%). Outras duas variantes também clinicamente relevantes, a HbD e a Hb Lepore, foram detetadas em, respetivamente, 101 (15,3%) e 74 (11,2%) casos (gráfico 1).

Gráfico 1: ▾ Espectro das variantes da hemoglobina com mobilidade eletroforética semelhante à Hb S detetadas em 660 casos analisados.



Este resultado confirmou o já descrito predomínio da HbS no espectro de variantes encontradas em Portugal seguido da HbD (*HBB*: c.364G>C) (2), também esta uma variante comum com dispersão mundial (5). A variante que ocupou o terceiro lugar foi a Hb Lepore. Esta tem por base uma lesão molecular invulgar, uma deleção que dá origem a um gene híbrido  $\delta\beta$ -globina, e é uma variante relativamente comum no centro de Portugal e Alta Extremadura Espanhola (6).

Os restantes 18 casos analisados foram classificados como variantes raras da hemoglobina (2,7%), tendo sido 11 deles identificados por estudos de genética molecular: Hb Maputo, Hb G-Coushatta, Hb Summer Hill, Hb D-Iran, Hb Setif, Hb Oleander, Hb Etobicoke, Hb Ottawa, Hb Matsue-Oki, Hb G-Waimanalo e Hb Q-India (gráfico 1 e quadro 1).

A variante Hb Matsue-Oki foi detetada em heterozigotia composta com a deleção  $\alpha$ -talassémica de 3,7Kb e a Hb Q-India foi detetada em dupla heterozigotia com  $\beta^0$ -talassémia (c.316-149\_\*342delinsAAGTAGA). Em ambos os casos, verificou-se a presença de anemia microcítica e hipocrômica que poderá ser explicada pela coexistência, respetivamente, da alfa- e da beta-talassémia. Todas as outras variantes raras foram detetadas em heterozigotia e encontram-se descritas na *Globin gene server database* (1) como sendo assintomáticas nessa condição. Contudo, é desconhecido se a sua a co-herança com HbS, com outra variante da hemoglobina, ou com talassémia, se traduz em alterações hematológicas ou clínicas relevantes. O largo espectro de variantes raras da hemoglobina que identificámos, e que já tinham sido descritas noutros locais do globo (1), poderá ser explicado pela vinda para Portugal de imigrantes provenientes de diversas regiões do mundo com elevada prevalência de hemoglobinopatias.

Quadro 1: Caracterização das variantes raras da hemoglobina.

Caso nº	Identificação presuntiva				Identificação definitiva		
	Focagem isoelétrica	Teste de solubilidade	HPLC-troca iónica (zona de migração da variante)	HPLC-fase reversa (cadeia globinica afetada)	Sequenciação de Sanger (alteração genética)	Alteração de aminoácido	Nome da variante de hemoglobina*
1	Mobilidade eletroforética semelhante à da Hb S	Negativo	Em zona da HbD	Beta-globina	<i>HBB</i> :c.142G>T	p.(Asp47Tyr)	Hb Maputo
2			Em zona da HbA <sub>2</sub>	Beta-globina	<i>HBB</i> :c.68A>C	p.(Glu22Ala)	Hb G-Coushatta
3			Em zona da HbS/HbD	Beta-globina	<i>HBB</i> : c.157G>C	p.(Asp52His)	Hb Summer Hill
4			Em zona da HbA <sub>2</sub>	Beta-globina	<i>HBB</i> :c.67G>C	p.(Glu22Gln)	Hb D-Iran
5			Em zona não identificada	Beta-globina	<i>HBA2</i> :c.283G>T	p.(Asp94Tyr)	Hb Setif
6			Em zona da HbD	Alfa-globina	<i>HBA2</i> : c.349G>C	p.(Glu116Gln)	Hb Oleander
7			Em zona não identificada	Alfa-globina	<i>HBA2</i> :c.255C>A	p.(Ser84Arg)	Hb Etobicoke
8			Em zona da HbS	Alfa-globina	<i>HBA2</i> :c.46G>C	p.(Gly15Arg)	Hb Ottawa
9			Em zona da HbS	Não detetada	<i>HBA2</i> :c.226G>A	p.(Asp75Asn)	Hb Matsue-Oki
10			Em zona da HbS	Não detetada	<i>HBA2</i> :c.193G>A	p.(Asp64Asn)	Hb G-Waimanalo
11			Em zona não identificada	Alfa-globina	<i>HBA1</i> :c.193G>C	p.(Asp64His)	Hb Q-India

\* Segundo *Globin Gene Server Database* (1)

## \_Conclusão

Concluimos que a combinação metodológica utilizada é adequada uma vez que permitiu o correto diagnóstico das variantes mais frequentes e com relevância clínica (HbS, HbD e Hb Lepore) e orientou o estudo molecular para a análise do gene globínico afetado, facilitando assim a identificação das variantes raras. A correta identificação de cada variante é essencial para um adequado acompanhamento clínico e aconselhamento genético dos doentes e dos seus familiares.

### Referências bibliográficas:

- (1) Globin gene server database [Em linha]. (consul. 13/11/2018). Disponível em: <http://globin.cse.psu.edu/>
- (2) Martins MC, Olim G, Melo J, et al. Hereditary anaemias in Portugal: epidemiology, public health significance, and control. *J Med Genet.* 1993;30(3):235-9. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1016307/>
- (3) Ryan K, Bain BJ, Worthington D, et al.; British Committee for Standards in Haematology. Significant haemoglobinopathies: guidelines for screening and diagnosis. *Br J Haematol.* 2010;149(1):35-49.
- (4) Traeger-Synodinos J, Hartevelde CL, Old JM, et al.; EMQN haemoglobinopathies best practice meeting. EMQN Best Practice Guidelines for molecular and haematology methods for carrier identification and prenatal diagnosis of the haemoglobinopathies. *Eur J Hum Genet.* 2015;23(4):426-37. Epub 2014 Jul 23. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4666573/>
- (5) Patel DK, Mashon RS, Patel S, et al.  $\beta$ -globin gene haplotypes linked with the Hb D-Punjab [ $\beta$ 121(GH4)Glu→Gln, GAA>CAA] mutation in eastern India. *Hemoglobin.* 2010;34(6):530-7.
- (6) Ribeiro ML, Cunha E, Gonçalves P, et al. Hb Lepore-Baltimore (delta 68Leu-beta 84Thr) and Hb Lepore-Washington-Boston (delta 87Gln-beta IVS-II-8) in central Portugal and Spanish Alta Extremadura. *Hum Genet.* 1997;99(5):669-73.