



Revisão / Review

## Identificação e caracterização de variantes novas e raras da hemoglobina humana

### *Identification of characterization of novel and rare variants of human hemoglobin*

Elza M. Kimura<sup>1</sup>

Denise M. Oliveira<sup>1</sup>

Susan E. D. C. Jorge<sup>1</sup>

Cristina F. Abreu<sup>1</sup>

Dulcinéia M. Albuquerque<sup>2</sup>

Fernando F. Costa<sup>2</sup>

Maria de Fátima Sonati<sup>1</sup>

*As anormalidades estruturais da hemoglobina estão entre as doenças genéticas mais comumente encontradas nas populações humanas. O Laboratório de Hemoglobinopatias do Departamento de Patologia Clínica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas – Unicamp, localizado em Campinas, no estado de São Paulo, região Sudeste do Brasil, realizou, em seus 27 anos de existência, cerca de 130.000 diagnósticos. Entre as variantes estruturais detectadas, as hemoglobinas S, C e D-Punjab foram, como esperado, as mais freqüentes, porém um número expressivo de outras hemoglobinas anômalas, novas e raras, também foi encontrado. Esses achados estão sumarizados no presente artigo. Rev. bras. hematol. hemoter. 2008;30(4):316-319.*

**Palavras-chave:** Hemoglobinopatias hereditárias; variantes estruturais; genes de globinas; população brasileira.

### Introdução

Mutações nos genes das globinas podem levar à produção de hemoglobinas estruturalmente alteradas.<sup>1</sup> Há, atualmente, mais de 900 variantes estruturais descritas, a maioria ocasionada por simples substituições de bases no DNA, com a correspondente troca de aminoácidos na proteína.<sup>2</sup> Embora a maior parte dos casos seja de cadeias  $\beta$ , alterações de cadeias  $\alpha$ ,  $\gamma$  e  $\delta$  são também relativamente comuns. Há um grande contingente não relacionado à sintomatologia clínica, mas algumas alterações afetam a estabilidade e/ou solubilidade da molécula ou modificam suas propriedades funcionais, levando às anemias hemolíticas e às eritrocitoses e cianoses, respectivamente. Há ainda variantes alongadas ou extremamente instáveis que resultam em fenótipos talassêmicos. Entre as variantes clinicamente importantes, a Hb S ( $\alpha_2\beta^S_2$ ), da anemia falciforme, é sem dúvida a mais conhecida.<sup>1,2</sup>

O Laboratório de Hemoglobinopatias do Departamento de Patologia Clínica da Faculdade de Ciências Médicas da

Unicamp, desde sua implantação, em 1980, analisou cerca de 130.000 amostras de sangue, provenientes de indivíduos com suspeita clínica de hemoglobinopatias e seus familiares, de doadores de sangue nos quais se detectou a presença de hemoglobinas estruturalmente alteradas, de programas de triagem neonatal e, ainda, de um programa sistemático de triagem de variantes desenvolvido no próprio laboratório. A maior parte das amostras é oriunda de indivíduos da região sudeste, mas outras regiões brasileiras também contribuíram para essa casuística, como a região nordeste e a região sul, bem como alguns outros países da América Latina, como a Argentina, o México, o Uruguai e a Venezuela. Até o momento, e excluindo-se as alterações de cadeias  $\delta$ , genericamente intituladas HbA<sub>2</sub>,<sup>3</sup> 10 variantes novas e 51 variantes raras foram detectadas e identificadas, sendo 9 delas mutações *de novo*; 21 são alterações de cadeias  $\alpha$ , 31 de cadeias  $\beta$  e 9 de cadeias  $\gamma$ , entre  $\gamma^G$  e  $\gamma^A$ . A maioria das variantes já descritas está sendo detectada no Brasil pela primeira vez. As tabelas de 1 a 4 apresentam esses resultados.

<sup>1</sup>Departamento de Patologia Clínica, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas – Unicamp, Campinas-SP.

<sup>2</sup>Centro de Hematologia e Hemoterapia, Unicamp, Campinas, SP.

**Correspondência:** Maria de Fátima Sonati

Departamento de Patologia Clínica, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas – Unicamp, Campinas-SP  
Caixa Postal 6111

13083-970 – Campinas-SP – Brasil

Tel.: 55 19 35219451; Fax 55 19 35219434

E-mails: [sonati@fcm.unicamp.br](mailto:sonati@fcm.unicamp.br) (preferido); [sonati\\_mf@yahoo.com.br](mailto:sonati_mf@yahoo.com.br) (alternativo)

Tabela 1. Variantes Novas de Hb

Hemoglobina	Mutação
Hb Fetal-Campinas	GamaA 121(GH4) Glu>Gln
Hb Fetal-Joanópolis	GamaG 73 (E17) Asp>Ala
Hb Fetal-Paulínia	GamaG 80 (EF4) Asp>Tir
Hb Boa Esperança	Alfa2 16(A14) Lis>Tre
Hb Campinas	Alfa2 26(B7) Ala>Val
Hb Bom Jesus da Lapa	Alfa1 30(B11) Glu>Ala
Hb Itapira	Alfa1 30(B11) Glu>Val
Hb Rio Claro	Beta 33(B15) Val>Met
Hb Poços de Caldas	Beta 61(E5) Lis>Gln
Hb Florida*	Beta 141 (-C); seqüência C- terminal modificada: (141)Tri-Pro-Tre-Ser-Ile-Tre-Lis-Leu-Ala-Fen-Leu-Leu-Ser-Asn-Fen-(156)Tir-COOH

\*Mutação de novo

Tabela 2. Variantes raras de Cadeias  $\alpha$ 

Hemoglobina	Mutação
Hb Kurosaki*	Alfa1 7(A5) Lis>Glu
Hb J-Paris	Alfa2 12(A10) Ala>Asp
Hb Hasharon	Híbrido Alfa2/ Alfa1 47(CE5) Asp>His ( $\alpha^{3,7}$ )
Hb J-Rovigo	Alfa2 53(E2) Ala>Asp
Hb Shaare Zedek	Alfa2 56(E5) Lis>Glu
Hb Pontoise	Alfa2 63(E12) Ala>Asp
Hb Ube-2	Alfa1 68(E17) Asn>Asp
Hb Daneshgah-Tehran	Alfa2 72(EF1) His>Arg
Hb G-Pest*	Alfa2 74(EF3) Asp>Asn
Hb Stanleville-II	Híbrido Alfa2/ Alfa1 78(EF7) Asn>Lis ( $\alpha^{3,7}$ )
Hb Tamano	Alfa1 89(FG1) His>Arg
Hb Cemenelum	Alfa2 92(FG4) Arg>Tri
Hb Setif	Alfa2 94(G1) Asp>Tir
Hb Sunshine Seth*	Alfa1 94(G1) Asp>His
Hb Westmead*	Alfa2 122(H5) His>Gln
Hb Jackson	Alfa2 127(H10) Lis>Asn
Hb Icaria	Alfa2 142, Stop>Lis; seqüência C- terminal modificada: (142)Lis-Ala-Gli-Ala-Ser-Val-Ala-Val-Pro-Pro-Ala-Arg-Tri-Ala-Ser-Gln-Arg-Ala-Leu-Leu-Pro-Ser-Leu-His-Arg-Pro-Fen-Leu-Val-Fen-(172)Glu-COOH

\*Mutações de novo

A principal forma de detecção é feita a partir da mudança na carga elétrica da variante em função da troca de aminoácidos ocorrida. A Figura 1 resume a estratégia metodológica utilizada. A eletroforese de hemoglobinas em acetato de celulose, em pH alcalino, e a cromatografia líquida de alta performance (HPLC – High Performance Liquid Chromatography), de troca catiônica, são as técnicas empregadas na triagem, esta última permitindo também a quantificação da fração anômala e das hemoglobinas A<sub>2</sub> e Fetal. As variantes assim detectadas são então submetidas à eletroforese em gel de ágar, em pH ácido, aos testes de solubilidade e estabilidade (térmica, em n-butanol e em isopropanol) e

Tabela 3. Variantes Raras de Cadeias  $\beta$ 

Hemoglobina	Mutação
Hb Deer Lodge	Beta 2(NA2) His>Arg
Hb G-San José	Beta 7(A4) Glu>Gli
Hb Porto Alegre	Beta 9(A6) Ser>Cis
Hb J-Baltimore	Beta 16(A13) Gli>Asp
Hb Miyashiro	Beta 23(B5) Val>Gli
Hb E	Beta 26(B8) Glu>Lis
Hb Grange-Blanche	Beta 27(B9) Ala>Val
Hb Pitie-Salpetriere	Beta 34(B16) Val>Fen
Hb Hammersmith*	Beta 42 (CD1) Fen>Ser
Hb Hoshida	Beta 43(CD2) Glu>Gln
Hb Osu Christiansborg*	Beta 52(D3) Asp>Asn
Hb Dhofar	Beta 58(E2) Pro>Arg
Hb Zurich	Beta 63(E7) His>Arg
Hb Korle-Bu	Beta 73(E17) Asp>Asn
Hb Santa Ana*	Beta 88(F4) Leu>Pro
Hb Redondo*	Beta 92(F8) His>Asn
Hb N-Baltimore	Beta 95(FG2) Lis>Glu
Hb Köln	Beta 98(FG5) Val>Met
Hb Coimbra	Beta 99(G1) Asp>Glu
Hb Camperdown	Beta 104(G6) Arg>Ser
Hb Indianápolis	Beta 112(G14) Cis>Arg
Hb Miami	Beta 116(G18) His>Pro
Hb D-Punjab	Beta 121(GH4) Glu>Gln
Hb Hofu	Beta 126(H4) Val>Glu
Hb J-Guantanamo	Beta 128(H6) Ala>Asp
Hb K-Woolwich	Beta 132(H10) Lis>Gln
Hb Lepore-Baltimore	Híbrido Delta-Beta (delta 50 Ser; beta 86 Ala)
Hb Lepore- Boston-Washington	Híbrido Delta-Beta (delta 87 Gln; beta 116 IVS-II-8)

\*Mutações de novo

Tabela 4. Variantes raras de Cadeias  $\gamma$ 

Hemoglobina	Mutação
Hb F-Pendergras	GamaA 36(C2) Pro>Arg
Hb F-Yamaguchi	GamaA 80(EF4) Asp>Asn E GamaA 75(E19) Ile>Tir
Hb F-Dickinson	GamaA 97(FG4) His>Arg
Hb F-Urumqi	GamaG 22(B4) Asp>Gli
Hb F-Carlton	GamaG 121(GH4) Glu>Lis
Hb F-Port Royal	GamaG 125(H3) Glu>Ala

à análise de cadeias globínicas, feita anteriormente por eletroforese e atualmente por HPLC de fase reversa (RP-HPLC). Paralelamente, os eritrócitos, após análise por contador eletrônico, são investigados quanto à presença de corpos de Heinz e de inclusão.<sup>3</sup>

Uma vez identificada a cadeia mutante, o gene correspondente é então seletivamente amplificado pela reação em cadeia da polimerase (PCR), e seqüenciado.<sup>4-6</sup> A confirmação

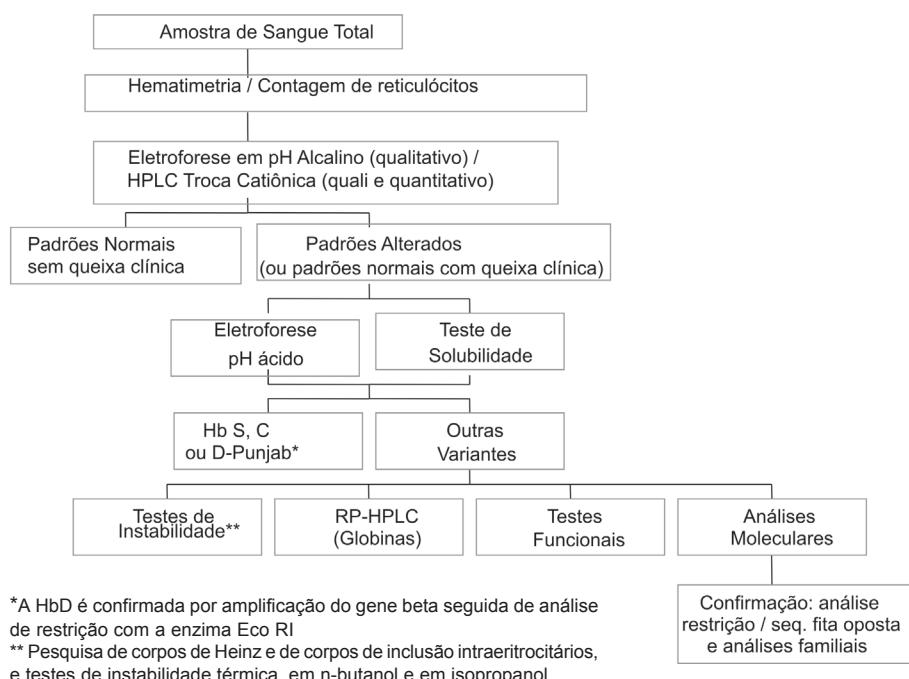


Figura 1. Representação Esquemática da Identificação e Caracterização de Variantes Estruturais da Hb

da mutação é feita, sempre que possível, por análise com enzimas de restrição e/ou seqüenciamento da fita oposta de DNA, além da análise familiar. No caso de variantes estruturais de cadeias  $\alpha$ , o *status* numérico desses genes é ainda investigado.<sup>7,8</sup>

Finalmente, as propriedades funcionais da molécula anômala são avaliadas pelo método de cinética química de Rossi-Fanelli e Antonini, de 1958, através da curva de dissociação da hemoglobina com o O<sub>2</sub>, da determinação da cooperatividade entre as cadeias globínicas e do efeito Bohr, na ausência e na presença de fosfatos orgânicos.<sup>9</sup>

Dentre as variantes clinicamente importantes aqui encontradas estão as hemoglobinas Hammersmith, Zürich, Redondo, Köln, Indianápolis, Miami, Hb Sunshine Seth e Miyashiro, proteínas instáveis que resultam em anemia hemolítica crônica de intensidade moderada a grave, as hemoglobinas Lepore-Baltimore e Lepore-Boston, híbridos de cadeias  $\delta$  e  $\beta$  associados a fenótipo talassêmico ( $\delta\beta^+$ ), a Hb Florida, constituída de cadeias  $\beta$  com 156 aminoácidos, hiperinstável e com fenótipo dominante de talassemia intermediária, a Hb E, também com fenótipo  $\beta$ -talassêmico, a Hb Coimbra e a Pitie-Salpetriere, encontradas em pacientes com eritrocitose, e as variantes Hasharon e Stanleyville-II, sempre associadas à deleção  $-\alpha^{3,7}$  e ao correspondente fenótipo  $\alpha$ -talassêmico.<sup>10-17</sup>

A Hb Boa Esperança foi detectada em dois portadores assintomáticos (doadores de sangue), mas os estudos *in vitro* revelaram propriedades funcionais alteradas, compensadas *in vivo*, provavelmente, pela maior proporção de

hemoglobina normal, de 75%.<sup>18</sup> Já a Hb Itapira foi a variante representada em menor porcentagem, com cerca de 5,5%, porque a mutação que a deu origem ocorreu em um alelo  $\alpha$  triplicado ( $\alpha\alpha\alpha^{\text{anti-3,7}}$ ).<sup>18</sup>

Algumas associações incomuns foram observadas. Heterozigotos da Hb Porto Alegre são geralmente assintomáticos, mas sua concomitância com a Hb Santa Ana, gerada por mutação de novo, levou a um quadro clínico de anemia hemolítica grave, com necessidade de esplenectomia.<sup>19</sup> A Hb Icaria, uma variante alongada e instável de cadeias  $\alpha$ , foi recentemente encontrada em associação com a deleção  $-(\alpha)^{20,5}$ , resultando em Doença da Hb H com altos níveis das hemoglobinas H e Bart's, de 15% e 19%, respectivamente. A Hb Miami foi detectada em uma criança heterozigota da talassemia  $\beta^+$ , o que levou a um quadro de anemia hemolítica bastante grave.

Esta paciente havia sido primeiramente estudada por Hoyer *et al.*, na Clínica Mayo, nos Estados Unidos.<sup>20</sup> A Hb S, além das associações com as hemoglobinas C e D e com a talassemia  $\beta$ , foi detectada em interação com as variantes J-Rovigo, Grange-Blanche e Stanleyville-II.<sup>10,17</sup> Esta última foi também detectada em associação com a Hb Campinas, uma das variantes novas descritas em nosso laboratório. A Hb Rio Claro, outra nova variante, foi encontrada em uma paciente também heterozigota da Hb Hasharon e, consequentemente, da talassemia  $\alpha^+$ .<sup>21</sup> As hemoglobinas D e J-Rovigo foram ainda detectadas em concomitância à talassemia  $\beta$ .<sup>10</sup>

Esses resultados ilustram a expressiva variabilidade de hemoglobinas presente nas populações. Do ponto de vista clínico, seu correto diagnóstico previne procedimentos e esquemas terapêuticos equivocados, particularmente quando os indivíduos apresentam microcitose e hipocromia, ou nos casos de variantes com o mesmo comportamento eletroforético ou cromatográfico daquelas mais frequentemente observadas, como a Hb S. Do ponto de vista bioquímico, o estudo das variantes e de suas respectivas substituições de resíduos tem fornecido um importante modelo para a compreensão dos aspectos estruturais e funcionais desta e de outras proteínas, o mesmo ocorrendo com os genes de globinas e seus sistemas regulatórios. Do ponto de vista de genética de populações, sua investigação contribui de maneira significativa para o conhecimento da composição étnica e dos graus de miscigenação entre os diferentes grupos populacionais.

**Abstract**

*Hemoglobin structural abnormalities are among the most commonly found human genetic diseases. The Laboratory of Hemoglobinopathies in the Clinical Pathology Department of the Medical Sciences School of the State University in Campinas - Unicamp, São Paulo, Southeastern Brazil, carried out, in its 27 years of activity, about 130,000 diagnoses. As expected, hemoglobins S, C and D were the most frequently observed variants, but an expressive number of other abnormal, novel and rare hemoglobins, was also detected. These findings are summarized in the present article.. Rev. bras. hematol. hemoter. 2008;30(4):316-319.*

**Key words:** Hereditary hemoglobinopathies; structural variants; globin genes; Brazilian population.

**Agradecimentos**

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes, pelo suporte financeiro aos projetos de pesquisa e pelas bolsas de estudo concedidas aos alunos de iniciação científica e de pós-graduação.

**Referências Bibliográficas**

- Steinberg MH, Forget BG, Higgs DR, Nagel RL. Disorders of Hemoglobin. Cambridge University Press, New York, 2001.
- Hardison RC, Chui DH, Giardine B *et al*. HbVar: A relational database of human hemoglobin variants and thalassemia mutations at the globin gene server. Hum Mutat. 2002;19(3):225-33 (<http://globin.cse.psu.edu>).
- Dacie JV, Lewis SM. Hematologia Prática de Dacie e Lewis, 9ª. ed., Artmed, Porto Alegre, 2006.
- Wenning MR, Kimura EM, Jorge SB *et al*. Molecular characterization of hemoglobins Kurosaki [alpha7 Lys-Glu], G-Pest [alpha74 Asp-Asn], Stanleyville-II [alpha78 Asn-Lys] and J-Rovigo [alpha53 Ala-Asp]. Acta Haematol. 1999; 102 (4):203-5.
- Kimura EM, Jorge SB, Ogo SH *et al*. A novel beta-globin variant: Hb Poços de Caldas [beta 61(E5)Lys-Gln]. Hemoglobin. 2002; 26(4):385-8.
- Duarte DF, Kimura EM, Albuquerque DM *et al*. Structural alterations of the gamma-globin genes in a Brazilian population. Hemoglobin. 2004;28(1):73-7.
- Dodé C, Krishnamoorthy R, Lamb J *et al*. Rapid analysis of -alpha 3.7 thalassaemia and alpha alpha alpha anti 3.7 triplication by enzymatic amplification analysis. Br J Haematol. 1993;83 (1):105-11.
- Tan AS, Quah TC, Low PS *et al*. A rapid and reliable 7-deletion multiplex polymerase chain reaction assay for alpha-thalassemia. Blood. 2001;98(1):250-1.
- Rossi-Fanelli A, Antonini E. Studies on the oxygen and carbon monoxide equilibria of human myoglobin. Arch Biochem Biophys. 1958;77(2):478-92.
- Abreu CF, Oliveira DM, Albuquerque DM *et al*. Hemoglobinas novas, raras e mutações de novo em pacientes atendidos no HC da Unicamp. Anais do 40º. Congresso Brasileiro de Patologia Clínica e Medicina Laboratorial (ISBN 85-60167-00-5), resumo 320, Curitiba (PR), setembro, 2006.
- Sonati MF, Kimura EM, Abreu CF *et al*. Hemoglobin Hammersmith [beta42 (CD1) Phe-Ser] in a Brazilian girl with congenital Heinz body hemolytic anemia. Pediatr Blood Cancer. 2006;47(6):855-6.
- Miranda SR, Kimura EM, Saad ST *et al*. Identification of Hb Zürich [alpha 2 beta 2(63)(E7)His-Arg] by DNA analysis in a Brazilian family. Hemoglobin. 1994;18(4-5):337-41.
- Fattori A, Kimura EM, Albuquerque DM *et al*. Hb Indianapolis [beta112 (G14) Cys-Arg] as the probable cause of moderate hemolytic anemia and renal damage in a Brazilian patient. Am J Hematol. 2007;82(7):672-5.
- Miranda SR, Figueiredo MS, Kerbauy J *et al*. Hb Lepore Baltimore (delta 50Ser beta 86Ala) identified by DNA analysis in a Brazilian family. Acta Haematol. 1994;91(1):7-9.
- Weinstein BI, Erramouspe B, Albuquerque DM *et al*. Hb Florida: a novel elongated C-terminal beta-globin variant causing dominant beta-thalassemia phenotype. Am J Hematol. 2006;81(5):358-60.
- Fattori A, Kimura EM, Albuquerque DM *et al*. Polycythemia and Hb Coimbra [beta99 (G1) Asp-Glu] in Brazil. Genet Mol Biol. 2006;29(2):200-2.
- Costa FF, Sonati MF, Zago MA. Hemoglobin Stanleyville II (alpha 78 Asn-Lys) is associated with a 3.7-kb alpha-globin gene deletion. Hum Genet. 1991;86(3):319-20.
- Jorge SE, Kimura EM, Oliveira DM *et al*. Three new alpha-globin variants: Hb Itapira [alpha30(B11)Glu-->Val (alpha1)], Hb Bom Jesus Da Lapa [alpha30(B11)Glu-->Ala (alpha1)] and Hb Boa Esperança [alpha16(A14)Lys-->Thr (alpha2)]. Hemoglobin. 2007; 31(2):151-7.
- Gonçalves MS, Sonati MF, Kimura M *et al*. Association of Hb Santa Ana [alpha 2 beta (2)88(F4)Leu- > Pro] and Hb Porto Alegre [alpha 2 beta (2)9(A6)Ser- > Cys] in a Brazilian female. Hemoglobin. 1994;18(3):235-9.
- Hoyer JD, Baxter JK, Moran AM *et al*. Two unstable beta chain variants associated with beta-thalassemia: Hb Miami [beta 116 (G18)his-->Pro], and Hb Hershey [beta70(E14)Ala-->Gly], and a second unstable Hb variant at 170: Hb Abington [beta70(E14)Ala-->Pro]. Hemoglobin. 2005;29(4):241-8.
- Grignoli CR, Wenning MR, Sonati MF *et al*. Hb Rio Claro [beta34(B16)Val-->Met]: a novel electrophoretically silent variant found in association with Hb Hasharon [alpha47(CE5)Asp-->His] and alpha-thalassemia-2(-alpha3.7). Hemoglobin. 1999;23(2): 177-82.

Avaliação: Editor e dois revisores externos  
Conflito de interesse: não declarado

Recebido: 19/09/2007  
Aceito: 25/09/2007