

DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE VARIANTES DE HEMOGLOBINA RARAS E NEUTRAS POR CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA DE FASE REVERSA (RP-HPLC)

Almendra V¹, Miranda A¹, Faustino P², Seixas MT¹

¹ Laboratório de Hematologia, Centro de Biopatologia, Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (INSA),

² Laboratório de Biologia Molecular, Centro de Genética Humana; (INSA), Lisboa.

As hemoglobinopatias são doenças monogénicas comuns resultantes de mutações que afectam os genes globínicos. Classificam-se em anomalias quantitativas, quando há ausência ou diminuição da síntese de uma cadeia globínica, ou qualitativas, quando há síntese de uma cadeia globínica estruturalmente anómala – variante de hemoglobina (Hb).

Os métodos de detecção de variantes de Hb geralmente utilizados no laboratório são a electroforese e a cromatografia. A separação de Hbs por estas metodologias baseia-se na sua diferença de cargas eléctricas. No entanto, estas metodologias falham na detecção de variantes cuja mutação não provoque alteração da carga eléctrica da molécula – variantes neutras. A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência de Fase Reversa (RP-HPLC) pode ser utilizada para detectar este grupo de variantes de Hb que apresentam diferenças apenas na sua hidrofobicidade.

Neste trabalho são apresentadas variantes de Hb raras e neutras detectadas na população portuguesa. A separação e quantificação das cadeias de globina foi efectuada por RP-HPLC, segundo o método proposto por Leone L. *et al* (1985), com uma recente adaptação de acordo com o descrito por Wajcman H. *et al* (2002). Para efectuar a caracterização molecular destas variantes, as regiões codificantes dos genes de beta-globina e da alfa-globina foram amplificadas por PCR (*Polymerase Chain Reaction*) e sequenciadas.

Utilizando esta metodologia detectámos as seguintes variantes de Hb pela primeira vez na população portuguesa:

- **Hb Palmela [alfa₁ 115(GH3) Ala→Val]** em associação com uma variante de cadeia beta Hb Malmö [beta 97(FG4) His→Gln]. Foi detectada pela primeira vez, num indivíduo português, com um fenótipo de eritrocitose explicado pela presença da variante Hb Malmö.

- **Hb Loves Park [beta 68(E12) Leu>Phe]** em heterozigotia. Detectada numa criança de 2 anos de idade, com cianose e anemia microcítica e hipocrómica, como resultado de uma mutação *de novo*. Foi descrita uma única vez numa família de origem Italiana, também associada a um fenótipo de anemia.

- **Hb Yaoundé [beta 134 (H12) Val>Ala]** em associação com Hb C [beta 6(A3) Glu->Lys]. Detectada numa amostra de um indivíduo português com índices eritrocitários normais. Esta variante foi descrita pela primeira vez, num indivíduo negro dos Camarões também em associação com outra variante (Hb Kenitra). Foi também descrita como Hb Mataro, quando detectada num recém nascido Sub-Sariano num programa de rastreio pré-natal para hemoglobinopatias.

- **Hb City of Hope [beta 69(E13) Gly>Ser]** em associação com beta⁰ talassémia (cd39-C>T) e Hb J-Paris-I [alfa 12(A10) Ala>Asp] numa mulher portuguesa com anemia microcítica e hipocrómica e um ligeiro aumento de Hb F. Esta variante foi previamente descrita em indivíduos de diferentes origens geográficas em heterozigotia e em associação com beta⁰ talassémia.

A análise das cadeias de globina por RP-HPLC assume um papel importante no diagnóstico de hemoglobinopatias uma vez que permite a separação completa das cadeias de globina (alfa, beta, delta e gama), e deste modo efectuar em simultâneo a identificação presuntiva e quantificação de variantes estruturais raras, assim como direccionar o diagnóstico. Possibilita a detecção de variantes silenciosas por outras metodologias permitindo a sua identificação na população portuguesa.