

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

“TRIAGEM NEONATAL DE HEMOGLOBINOPATIAS EM PAPEL DE FILTRO”

ANDRÉ LUIZ PRADO LEAL

Monografia apresentada à coordenação do Curso de Ciências
Biológicas, da Universidade Federal de Uberlândia, para a
obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Uberlândia – MG
Julho de 1999

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

“TRIAGEM NEONATAL DE HEMOGLOBINOPATIAS EM PAPEL DE FILTRO”

ANDRÉ LUIZ PRADO LEAL

SILVIO MARQUES PESSOA

Monografia apresentada à coordenação do Curso de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Uberlândia, para a obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Uberlândia – MG
Julho de 1999

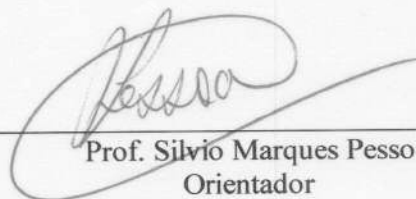
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

“TRIAGEM NEONATAL DE HEMOGLOBINOPATIAS EM PAPEL DE FILTRO”

ANDRÉ LUIZ PRADO LEAL

APROVADA PELA BANCA EXAMINADORA 02/08/99

Nota 10 (dez)



Prof. Silvio Marques Pessoa
Orientador

Prof. Ademir Barsanulfo de Moraes
Co-orientador

Prof. Antônio Alves Duarte
Co-orientador

Ana Maria Coelho Carvalho
Universidade Federal de Uberlândia
Centro de Ciências Biomédicas
Prof. Ana Maria Coelho Carvalho
Coordenadora do Curso de Ciências Biológicas

Uberlândia 02 de Agosto de 1999

Agradecimentos:

A Deus por ter me ajudado em mais essa realização, e por ter colocado em meu caminho algumas pessoas que foram muito importantes na minha formação acadêmica.

Ao Médico Patologista Clínico, e Prof. do Departamento de Clínica Médica da UFU Silvio Marques Pessoa, meu orientador, pela paciência e dedicação durante a realização deste trabalho.

Aos meus co-orientadores:

Médicos Patologistas Clínicos e profs. do Departamento de Clínica Médica da UFU, Ademir Barsunulfo de Moraes, chefe do Laboratório de Análises Clínicas da UFU, e Antônio Alves Duarte.

A Dra. Maria Helena da Cunha Ferraz, Profª. Adjunta do Dep. Propedêutica Complementar/Faculdade de Medicina da UFMG - Membro do Laboratório de hemoglobinopatias do NUPAD.

A Maria Cristina Paixão - Bioquímica responsável pelo Laboratório de Hemoglobinopatias do NUPAD.

Aos Meus pais: Luiz Francisco Leal e Rosa Marly de Souza Leal pelo apoio e compreensão durante esses anos.

Aos meus irmãos: Daniel, Israel, Isaac, Rosimeiry, Eloiza, Edith, Cássia e Natanael.

Aos meus tios João Alberto e Catarina; e a Paulo Fernando e Rita pelo apoio.

À prof. Dra. Marlene Terezinha de Munro Colesante.

Aos farmacêuticos e bioquímicos: Alexandre de Brito, chefe do setor de hematologia do Laboratório de Análises Clínicas da UFU; Cleber Franco Queiroz e Mara Regina Lopes, do Laboratório da Prefeitura Municipal de Uberlândia por não terem medido esforços para coleta das amostras.

A todos os técnicos do setor de Hematologia da UFU.

Às Biólogas Silma Maria Alves de Melo e Ângela Ferreira S. Rocha do Hemocentro regional de Uberlândia, pelo apoio, e a todos os colegas com quem convivi e de uma forma ou outra contribuíram para a minha formação.

***“Se és capaz de, entre a plebe, não te corromperes
e, entre reis, não perder a naturalidade
e de amigos, quer bons, quer maus, te defenderes,
se a todos podes ser de alguma utilidade,
e se és capaz de dar, segundo por segundo,
ao minuto fatal todo valor e brilho,
tua és a terra com tudo que existe no mundo
e o que é mais - tu és um Homem, ó meu filho!”***

Rydyard Kipling

Resumo

O presente trabalho foi realizado objetivando estudar a técnica de eletroforese em gel de ágar e acetato de celulose, usando como material biológico sangue colhido por punção capilar e acondicionado em papel de filtro, sendo então realizado o "screening" neonatal para hemoglobinopatias.

Foram realizados 347 testes dos quais encontramos 16 testes positivos para hemoglobinas variantes, sendo 9 de hemoglobina S (HbS) e, 7 de hemoglobina C (HbC). A eletroforese em acetato de celulose foi realizada usando tampão pH 8,4, e a eletroforese em gel de ágar foi realizada usando tampão pH 6,2. Para revelar a leitura usamos solução de benzidina, que apresenta a vantagem de rapidez, não necessitando de descoloração, além de apresentar custo bastante baixo. Nossos resultados foram comparados com os resultados dos exames realizados na faculdade de medicina da UFMG pelo NUPAD (Núcleo de Pesquisa em Apoio ao Diagnóstico), que foi considerado o nosso padrão ouro, apresentando uma especificidade e sensibilidade de 100% e valor preditivo positivo e negativo também de 100%, apresentando uma incidência de 1:38,6 de HbS e 1:49,6 de HbC.

O método mostrou, portanto ser eficiente para triagem de hemoglobinopatias do recém-nascido, podendo ser utilizado em laboratórios clínicos em geral.

Palavras chave: Papel de Filtro, Eletroforese de Hemoglobina, Triagem.

Índice

1	INTRODUÇÃO	1
2	OBJETIVOS	7
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	8
3.1	MATERIAL BIOLÓGICO	8
3.2	MATERIAIS E EQUIPAMENTOS	8
3.3	REAGENTES	8
3.3.1	<i>Reagente hemolisante.....</i>	8
3.3.2	<i>Tampão Tris-borato EDTA pH 8,4.....</i>	8
3.3.3	<i>Tampão fosfato pH 6,2</i>	9
3.3.4	<i>Ágar-gel.....</i>	9
3.3.5	<i>Solução estoque de benzidina 1%.....</i>	9
3.3.6	<i>Solução estoque de ferrocianeto de potássio 1%</i>	9
3.3.7	<i>Solução de uso para coloração</i>	9
3.3.8	<i>Padrão de hemoglobina FAS.....</i>	9
3.4	PROCEDIMENTO TÉCNICO.....	10
4	RESULTADOS	15
5	DISCUSSÃO E CONCLUSÕES.....	17
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	19

1 Introdução

As anormalidades hereditárias em relação à síntese de hemoglobinas podem ser divididas em dois grupos:

- 1^o) Variante estruturalmente anormal.
- 2^o) Síntese reduzida de uma ou mais cadeias polipeptídicas da hemoglobina.

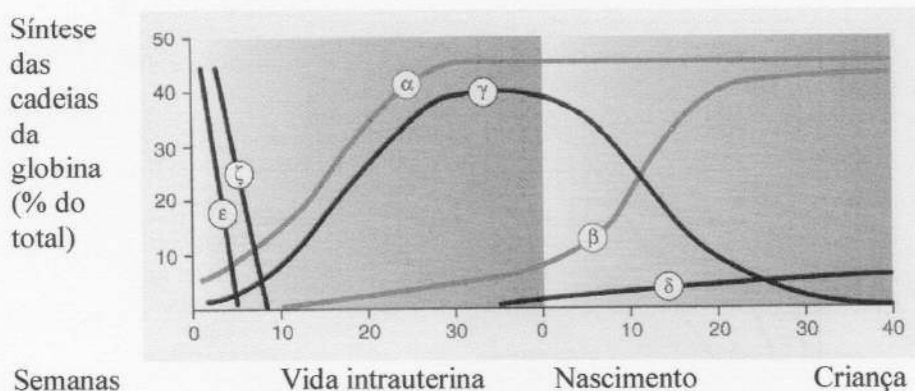
O termo hemoglobinopatia é usado para designar o primeiro e talassemia para o segundo grupo.

Mutações envolvendo os genes estruturais promovem a formação de moléculas de hemoglobinas com características bioquímicas diferentes aos das hemoglobinas normais e são por isso denominadas de hemoglobinas variantes. Mutações afetando os genes reguladores promovem desequilíbrio no conteúdo quantitativo das cadeias e conseqüentemente dos tipos normais de hemoglobinas, causando as talassemias. A maioria das variantes é originada por simples substituição de aminoácidos, provavelmente resultantes de mudanças nas seqüências dos nucleotídeos (NAOUM, 1987).

A hemoglobina normal é uma molécula globular oligomérica cuja principal função é o transporte de oxigênio. Quimicamente é composta pela conjugação de um pigmento, o heme, e uma proteína, a globina. O heme é um complexo formado por um átomo de ferro, situado no interior de uma estrutura porfirínica que o mantém no estado ferroso e lhe dá a cor vermelha característica. A globina consiste de dois pares de cadeias polipeptídicas. Duas das cadeias que participam da formação do tetrâmero possuem 141 aminoácidos cada e são denominadas tipo alfa, e as outras duas com 146 aminoácidos cada, são conhecidas por tipo beta.

A composição da hemoglobina (Hb) no eritrócito difere segundo a idade gestacional e a idade pós-natal. Estas alterações são devidas a alterações na ativação e inativação ou substituição nos genes da globina, processando do zeta para alpha gen no cromossoma 16 e do épsilon para o gama, delta, ou beta genes no cromossoma 11. Os genes épsilon e zeta normalmente aparecem somente nos tres primeiros meses de vida embrionária. As cadeias épsilon e zeta em adição ás cadeias alpha e gama são constituintes das hemoglobinas embrionárias. O gráfico abaixo representa a produção de cadeias da globina da vida intrauterina ao adulto.

Produção de cadeias da globina



A hemoglobina normal do adulto é constituída predominantemente de HbA ($\alpha_2\beta_2$) e pequena quantidade de HbA2 ($\alpha_2\delta_2$) e HbF ($\alpha_2\gamma_2$). A hemoglobina normal do recém-nascido é constituída de um predomínio de HbF e pequena quantidade de HbA. Abaixo está relacionada a constituição normal das hemoglobinas da vida intrauterina ao adulto.

Hemoglobinas normais

Tempo de vida	Cadeia de globina	Hemoglobina
Intrauterina		
Embriogênese precoce (produção no saco vitelino)	$\zeta + \epsilon$	Gower-1
	$\alpha + \epsilon$	Gower-2
	$\delta + \gamma$	Portland
Início precoce, pico no meio da gestação e início de rápido declínio justamente após o nascimento	$\alpha + \gamma$	Fetal
Ao nascimento	$\alpha + \gamma$	HbF 60 a 90%
	$\alpha + \beta$	HbA 10 a 40%
Após seis meses de idade e adulto	$\alpha + \beta$	HbA > 95%
	$\alpha + \gamma$	HbF < 1-2%
	$\alpha + \delta$	HbA2 < 3,7%

A seqüência dos eventos levados a nosso conhecimento das hemoglobinopatias e talassemias é de grande valor histórico.

HERRICK (1910), relatou a presença de “corpúsculos vermelhos estranhos alongados, em forma de foice” em um estudante negro portador de “um caso de anemia severa”. EMMEL (1917), observou a transformação de “corpúsculos vermelhos” para a forma de foice “in vitro”. Ele também notou que a falcização ocorria em pessoas com anemia severa e em outras pessoas aparentemente saudáveis, reconhecendo então, ambas, a doença e o portador.

Os estudos de HAHN & GILLESPIE (1927) determinaram condições que afetavam a formação de células falciformes “in vitro”, incluindo pH, temperatura, fixadores, tonicidade e outras. Entre suas observações a mais notável foi a de que a exclusão do oxigênio era um pré-requisito para a falcização e que o fenômeno poderia ser reversível, uma vez realizando a re-exposição ao oxigênio. Eles presumiram que os efeitos semelhantes do oxigênio poderiam ocorrer “in vivo”, com a hipóxia levando a distorção celular, com conseqüente hemólise. Mais tarde HAHN aplicou o termo “traço falciforme” para pacientes assintomáticos, associados ao fenômeno de falcização “in vitro”. Ele realizou estudos familiares e determinou que o traço era herdado em caráter dominante.

Paralelamente a este evento, o relato de COOLEY & LEE (1925), que separaram do complexo de distúrbios da criança e adolescentes que tinha sido conhecido como anemia de Von Jaksch, uma síndrome caracterizada por anemia crônica, progressiva, de início na infância, com pronunciada eritroblastose no sangue periférico, facies característica, esplenomegalia e incidência familiar. A observação da procedência do mediterrâneo levou a introdução do termo talassemia, derivado da palavra grega para o mar. Neste período e nos anos seguintes, apareceram descrições na literatura italiana de desordens mais brandas, encontradas em adultos e também em crianças, que eram marcadas por anormalidades morfológicas nas hemácias e diminuição da fragilidade osmótica (microeliptopoiquilocitose, Doença de Rietti-Greppi-Micheli). CAMINOPETROS (1938) notou que os pais de crianças acometidas por talassemia severa eram portadores de hemácias com fragilidade osmótica diminuída, porém mesmo assim, a verdadeira relação entre anemia de Cooley e a síndrome de Rietti-Greppi-Micheli não foi percebida.

Curiosidades com respeito ao significado da presença de pontilhado basófilo nas hemácias de alguns adultos com doença menos grave levou a descrição por WINTROBE e Cols. (1940), o que eles consideravam ser uma forma branda da anemia de Cooley. Também

foi demonstrado que a manifestação estava presente em ambos os pais de crianças com a clássica anemia de Cooley. Posteriormente estudos genéticos estabeleceram que a anemia de Cooley é um estado homocigoto para um gene autossômico parcialmente dominante, e que os pacientes descritos por Rietti e por Wintrobe representava caracteres heterocigotos.

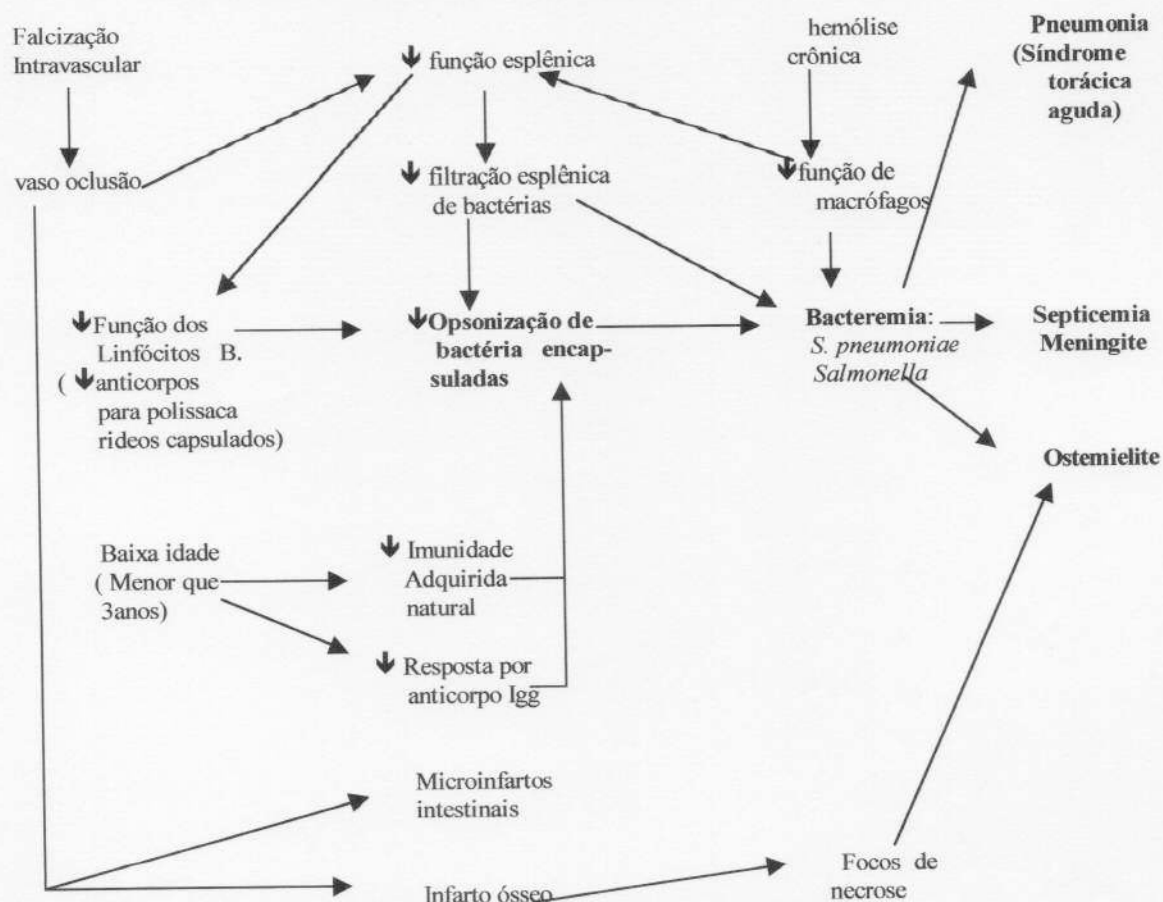
GLEIMAM (1940), reinvestigou o fenômeno de falcização, que confirmou a observação de Hahn e Gillespie com respeito a reversibilidade e importância do oxigênio. SHERMAN (1940), descreveu que as células na anemia falciforme eram birrefringentes, uma observação, que despertou curiosidades, mas permaneceu sem explicação por aproximadamente uma década. PAULING (1949) convencido da possibilidade da interação entre moléculas de hemoglobina anormal pode explicar este fenômeno. Pauling juntamente com Itano, demonstraram uma hemoglobina eletroforicamente anormal na anemia falciforme, originando então o conceito de doença com base molecular.

No mesmo ano que Pauling fez sua descoberta, NEEL (1949) estabeleceu que o traço falciforme era heterocigoto e a anemia falciforme era um estado homocigoto para o mesmo gene. A ciência da biologia molecular teve seu incremento com a demonstração de INGRAM (1956), da diferença na seqüência de aminoácidos em uma pequena parte da cadeia de polipeptídeos da anemia falciforme. Atualmente então são definidos pacientes portadores do traço falciforme, anemia falciforme e síndrome falcêmica que inclui aqueles portadores da hemoglobina S em caráter heterocigoto.

Desde a década de 1970 tem se conhecimento do aumento da suscetibilidade a infecções bacterianas de crianças portadoras de anemia falciforme. O aumento da mortalidade e morbidade em crianças devido ao seqüestro esplênico agudo e septicemia bacteriana fulminante tem sido bem documentada. Uma melhora significativa tem sido observada nestes pacientes, devido ao diagnóstico precoce e a um acompanhamento clínico mais apurado. (EMOND *et al.* 1985; VICHINSKY *et al.* 1988; POWARS *et al.* 1981).

O primeiro programa estatal amplo para "screening" de hemoglobinopatias foi iniciado em New York em 1975, mas o ímpeto por um "screening" mais amplo veio com a demonstração da redução da mortalidade e morbidade na anemia falciforme devido a um acompanhamento clínico mais adequado, particularmente através da prevenção de septicemia por pneumococo em crianças com anemia falciforme que foi demonstrado em estudos multicêntricos americanos em 1987 (GASTON *et al.* 1986).

A patogênese da infecção na anemia falciforme pode ser resumida no quadro abaixo:



Patogênese da infecção na anemia falciforme. (modificado por Wang WC. Doença falciforme. New York: Churchill Livingstone, 1992) - (Wintrobe, 1998).

No Brasil um dos programas de triagem neonatal pioneiro no campo das hemoglobinopatias, é realizado na faculdade de medicina da UFMG, pelo NUPAD (Núcleo de Pesquisa em Apoio ao Diagnóstico), o qual realiza triagem no estado de Minas Gerais.

Os exames do NUPAD são realizados com a utilização da técnica de eletroforese por focalização iso elétrica.

A meta principal do screening neonatal para síndromes falcêmicas é a redução na morbidade e mortalidade pela identificação de crianças afetadas ao nascimento, iniciando precocemente a profilaxia com penicilina e promovendo um acompanhamento adequado por profissionais de saúde.

Cada metodologia se baseia na detecção de pequena quantidade da hemoglobina anormal, na presença de grande quantidade de Hemoglobina fetal. O padrão observado em crianças destinadas a apresentar anemia falciforme, compreende a presença de HbF, relativamente menor quantidade de HbS, e ausência de HbA. Recém-nascidos com dupla

heterozigose para HbS e β^0 talassemia e para HbS e HPFH (Persistência Hereditária de Hemoglobina Fetal) tem um padrão eletroforético indistinguível da HbSS. Eles deverão ser diferenciados testando-se os pais para hemoglobinopatias ou repetindo-se o teste na criança mais tardiamente. Outra falha diagnóstica é a presença de $S\beta^+$ talassemia, pela incorreta identificação de FS ou FAS (traço falciforme), ao invés do padrão correto FSA. É interessante enfatizar também os defeitos moleculares que ocorrem nos principais tipos de hemoglobinopatias, que são os tipos: HbD, HbS, HbC e HbE sendo que o defeito que ocorre na HbD é a mutação do resíduo 121 da cadeia beta (ácido glutâmico), sendo substituído pela glutamina ou $\beta 121 \text{ glu} \rightarrow \text{Gln}$; Na HbS ocorre uma substituição de uma base nitrogenada do códon GAG para GTG, resultando na substituição do ácido glutâmico (Glu) pela valina (Val) na posição número 6 da globina beta; A HbC origina-se da substituição do aminoácido número 6 da globina beta, o ácido glutâmico (Glu) pela lisina (Lis). A troca de um aminoácido de carga negativa por um de carga positiva altera completamente a mobilidade eletroforética da hemoglobina mutante, sendo facilmente diferenciável da HbA e de outros tipos de variantes; A HbE é originada pela substituição da Lisina da posição 26 da cadeia beta por ácido glutâmico, ou $\text{Lis} \rightarrow \text{Glu}$, sendo que em eletroforese de pH alcalino a fração de HbE se posiciona ligeiramente mais rápida do que a HbC, sendo, portanto confundida com essa hemoglobina. A diferenciação entre as HbC e HbE é realizada por eletroforese em pH 6,2.

A aplicação clínica de técnicas de DNA recombinante permite diagnóstico pré-natal preciso para anemia falciforme, com relativamente pequeno risco para o feto. As técnicas iniciais requeriam amostras de sangue, porém mais recentemente é possível fazer o diagnóstico através do líquido amniótico ou através de biópsia de vilo coriônico.

2 Objetivos

Realizar triagem de hemoglobinopatias em recém-nascidos, principalmente para o traço ou doença falciforme.

Padronizar a técnica do estudo de hemoglobina em sangue colhido em papel de filtro no Laboratório de Análises Clínicas do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia.

3 Materiais e métodos

3.1 Material biológico

Foram analisadas 347 amostras de sangue de recém-nascidos, com idade entre 5 e 30 dias, colhidas através de punção capilar, no laboratório da Prefeitura Municipal de Uberlândia. Estas amostras foram colhidas em duplicata, sendo uma parte analisada no Laboratório de Análises Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia, e a outra enviada ao NUPAD de Belo Horizonte.

3.2 Materiais e Equipamentos

Para a realização dos testes foram utilizados:

- um conjunto de eletroforese com voltagem regulável do modelo Helena Laboratórios
- Papel de filtro S&S (Schleicher & Schuel) 903
- Alicata para picotar papel (diâmetro de 3mm)
- Placa de microtitulação com fundo em U
- Placa para confecção do ágar-gel
- Dispositivo para realização de orifícios no ágar-gel: suporte para placa de vidro e "pente"
- Placas de Petri

3.3 Reagentes

3.3.1 Reagente hemolisante

EDTA (ácido etileno diaminotetracético).....	0,25 g
KCN (cianeto de potássio).....	0,005 g
Água destilada q.s.p.....	100 ml

3.3.2 Tampão Tris-borato EDTA pH 8,4

TRIS (hidroximetilaminometano).....	10,2 g
EDTA (ácido etileno diaminotetracético).....	0,6 g
Ácido bórico.....	3,2 g
Água destilada q.s.p.....	1000 ml

Estocar em geladeira 2 a 8°C. Medir o pH antes de cada uso.

3.3.3 Tampão fosfato pH 6,2

Na ₂ HPO ₄	2,02 g
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O.....	7,66 g
Água destilada q.s.p.....	1000 ml

Estocar em geladeira 2 a 8°C. Medir o pH antes de cada uso.

3.3.4 Ágar-gel

Tampão fosfato pH 6,2.....	20 ml
Ágar-ágar (Difco).....	0,3 g

Preparar no momento do uso.

3.3.5 Solução estoque de benzidina 1%

Benzidina.....	1,0 g
Ácido acético glacial.....	25 ml
Água destilada q.s.p.....	100 ml

Estocar em geladeira 2 a 8°C.

3.3.6 Solução estoque de ferrocianeto de potássio 1%

Ferrocianeto de potássio.....	1,0 g
Água destilada q.s.p.....	100ml

3.3.7 Solução de uso para coloração

Solução estoque de Benzidina 1%.....	10ml
Solução estoque de ferrocianeto de potássio 1%.....	5ml
Água destilada.....	10ml
Água oxigenada (3,0%).....	12 gotas

Preparar no momento do uso em uma placa de Petri.

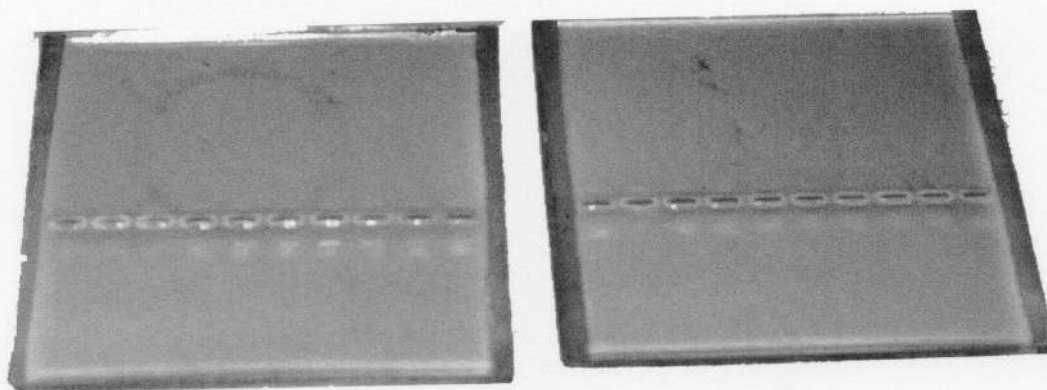
3.3.8 Padrão de hemoglobina FAS

Sangue de cordão umbilical em EDTA.....	1 ml
Sangue AS em EDTA.....	1 ml

Homogeneizar e aplicar em papel de filtro (mesmo papel usado para coleta de sangue das amostras-teste).

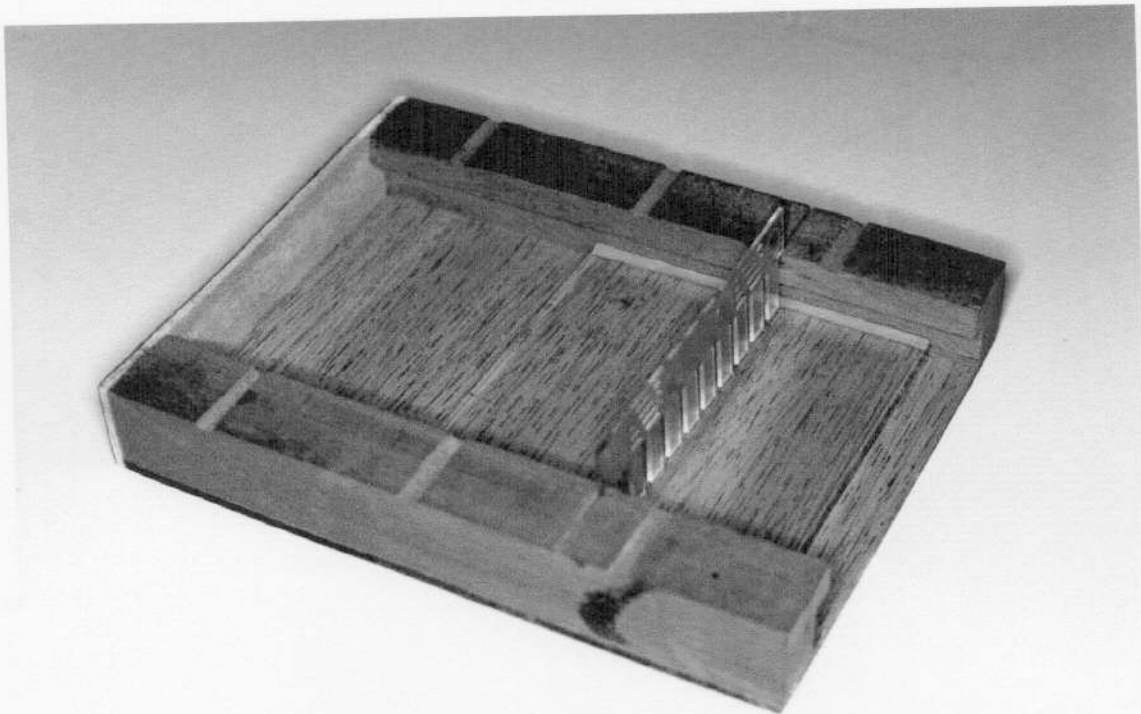
3.4 Procedimento técnico

A placa para confecção do ágar-gel foi feita no próprio Laboratório, utilizando uma placa de vidro cortada com as medidas de 8,0 x 8,7 cm, apresentando em seu contorno lateral pequena elevação, constituída por uma tira plástica aí colada, de aproximadamente 1 a 2 mm de espessura e 2 mm de largura. Esta placa permitiu a confecção do ágar-gel com 1 a 2 mm de espessura. Ver figura abaixo.

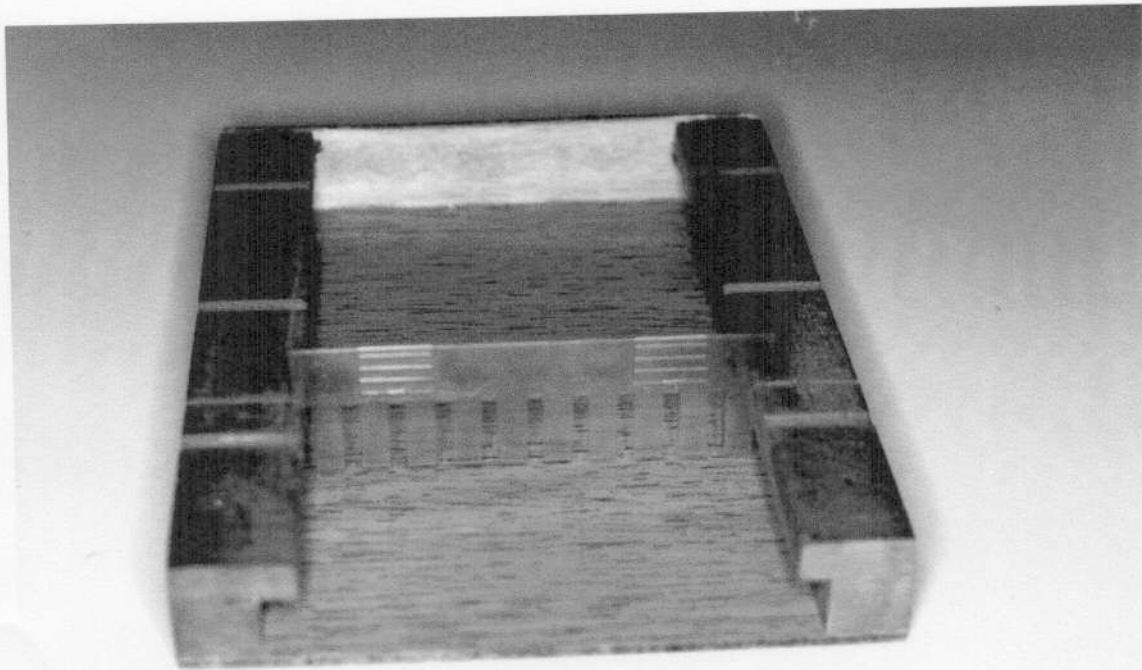


Placas de ágar-gel

O dispositivo para realização dos orifícios para aplicação das amostras foi feito na marcenaria da UFU. Constituído por uma placa de madeira, com medidas para adaptar a placa de vidro contendo ágar-gel. Nas bordas laterais do dispositivo foi colado pequeno bloco de madeira, com altura que permitiu realizar os orifícios com profundidade de aproximadamente 1 a 2 mm, utilizando um "pente". Este "pente", em material plástico, contém 10 "dentes" com 4 mm de largura e intervalo de 3 mm. Com estes dispositivos foi possível realizar no ágar-gel, orifícios de aproximadamente 4 mm de comprimento, 1 mm de largura e 1 mm de profundidade. Ver figura abaixo (página seguinte).



Dispositivo para confecção do ágar-gel com placa de vidro e "pente"



Dispositivo para confecção do ágar-gel com "pente"

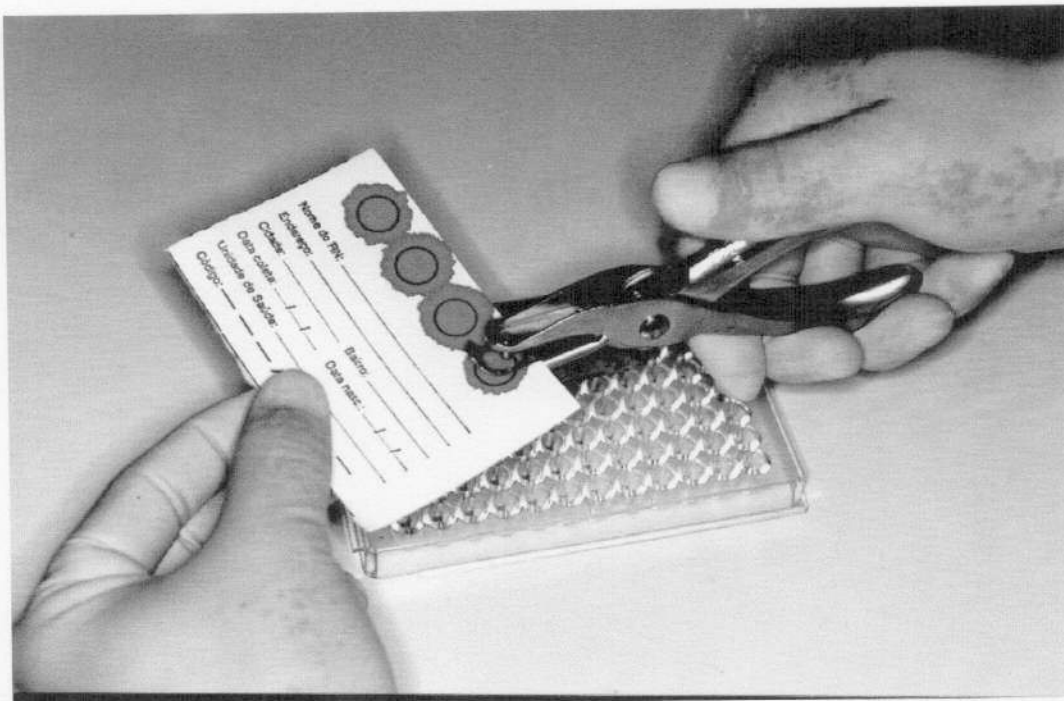
O sangue foi colhido em papel de filtro S&S 903, contendo 4 círculos de 1,0 cm de diâmetro, especialmente preparado para coleta de amostra capilar. Depois do preenchimento adequado de cada círculo, as amostras foram deixadas secar, ao ar, à temperatura ambiente, em suporte de madeira. Ver figura abaixo.



Papel de filtro impregnado com sangue

As amostras foram armazenadas em geladeira 2 a 8°C, em envelope de papel, até a realização dos testes.

O papel de filtro, impregnado com sangue, foi cortado com o alicate e cada disco de 3 mm de diâmetro foi colocado em um orifício de uma placa de microtitulação com fundo em U, devidamente identificada. Ver figura abaixo (página seguinte).



Corte do papel de filtro

A eluição foi realizada acrescentando 25 μ l da solução hemolisante em cada orifício. O eluato foi utilizado para aplicação pelo menos 1 hora após, podendo o tempo ser prolongado, desde que a placa seja mantida em geladeira e os orifícios cobertos com fita adesiva para proteger contra evaporação.

O ágar-gel foi preparado em erlenmeyer de 200 ml, sendo aquecido em bico de bunsen até dissolução completa. Em seguida deixado resfriar até temperatura de aproximadamente 45°C e colocado sobre a placa de vidro, acima citada, de modo a formar uma película de aproximadamente 1 a 2 mm de espessura (em torno de 7 ml de ágar-gel em cada placa). A placa de vidro com o ágar-gel foi colocada no suporte, acima citado, e com o "pente", pressionado contra o ágar, foram realizados os orifícios há 3 a 4 cm da borda. O ágar-gel foi utilizado a partir de 30 minutos da confecção e, às vezes, no dia seguinte, desde que mantido em geladeira e protegido contra evaporação.

Eletrforese em ágar-gel em pH 6,2. O eluato de hemoglobina foi aplicado na quantidade de aproximadamente 1 a 2 μ l em cada orifício da placa. Lembramos que, em cada corrida, foi incluído um padrão de hemoglobina FAS, tratado da mesma forma que as amostras teste. Após a penetração do eluato de hemoglobina no ágar foi realizada a corrida eletroforética. Nos dez primeiros minutos usamos 90 volts e, em seguida, por mais trinta

minutos, 140 volts. Em seguida, usando uma placa de Petri, o ágar-gel foi mergulhado na solução de benidina de uso (solução corante) por aproximadamente 1 a 2 minutos. Logo após o ágar-gel foi mergulhado em uma segunda placa de Petri contendo água destilada. Nesta etapa foram realizados dois banhos de água. Em seguida o ágar-gel foi transferido, cuidadosamente, para um suporte plástico, sendo realizada uma análise qualitativa inicial. A secagem do ágar-gel se deu à temperatura ambiente, sendo, então realizada a análise final por comparação com o padrão FAS.

Eletroforese em acetato de celulose pH 8,4. Paralelamente foi realizada corrida eletroforética em acetato de celulose. O eluato de hemoglobina foi aplicado na quantidade de 1 a 2 μ l por amostra, sendo aplicado conjuntamente com padrão FAS. A corrida, realizada em 200 volts fixos. A coloração, realizada da mesma forma que para eletroforese em ágar-gel.

4 Resultados

Foram analisadas 347 amostras. Obtivemos 331 resultados normais e 16 resultados anormais. Do ponto de vista clínico, caracterizados por 9 casos de HbFAS e 7 de HbFAC. (Ver tabela abaixo).

Tabela 1: Resultado das amostras (pH ácido e pH alcalino)

Genótipos	Número de portadores
HbFAS	9
HbFAC	7
Hemoglobinas Normais AF	331
Total	347

Os resultados obtidos pela eletroforese em pH ácido e básico foram comparados com os resultados do NUPAD da Faculdade de Medicina da UFMG, os quais foram considerados o nosso padrão ouro. Houve correlação em todos os casos analisados.

A comparação de nossos resultados com os do NUPAD consta na tabela 2.

Tabela 2: comparação de resultados

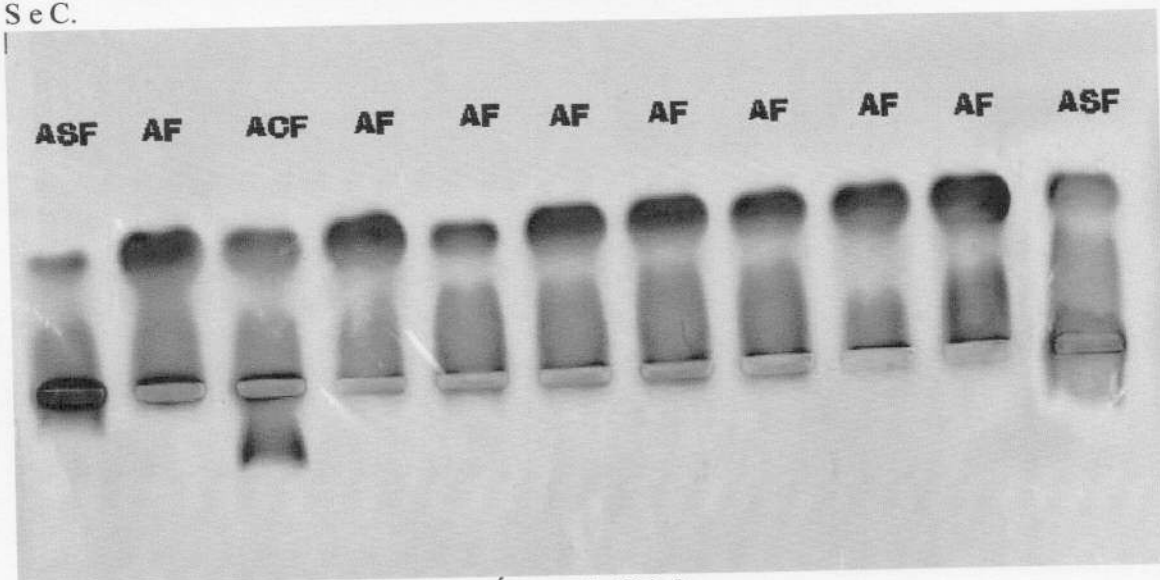
Parâmetros comparados	Resultado
Sensibilidade	100%
Especificidade	100%
Falsos positivos	0%
Falsos negativos	0%
Valor Preditivo Positivo	100%
Valor Preditivo Negativo	100%

A incidência de hemoglobinas anormais, verificada em nossa investigação, está apresentada na tabela 3:

Tabela 3: Incidência de hemoglobinas anormais

Hemoglobina S (HbFAS, futuro HbAS)	1:38,6 (2,6%)
Hemoglobina C (HbFAC, futuro HbAC)	1:49,6 (2,0%)

A figura abaixo mostra um gel de ágar pH 6,2, destacando a presença de hemoglobina S e C.



Ágar-gel pH 6,2

A figura abaixo mostra um ágar-gel, onde as amostras 1 a 7 e 9 apresentam o padrão AF, a amostra 8 apresenta o padrão A, e a amostra 10 apresenta padrão FAS.



Ágar-gel pH 6,2

5 Discussão e conclusões

O presente trabalho aborda a triagem neonatal de hemoglobinas anormais pelo método de eletroforese em ágar-gel e acetato de celulose. Os resultados obtidos foram a incidência de 1:38,6 (2,6%) de HbFAS, futuro HbAS (traço falcêmico) e, 1:49,6 (2,0%) de hemoglobina HbFAC, futuro HbAC. Obtivemos uma especificidade e sensibilidade de 100% quando comparados com os testes realizados em EFIE (eletroforese por focalização isoeletrica). Considerando o baixo custo desta metodologia e os benefícios do diagnóstico em doenças de hemoglobinas anormais, é plenamente justificável a realização deste teste em todos os recém-nascidos, justificando-se pela diminuição da mortalidade e morbidade em que o diagnóstico precoce pode contribuir.

Comparando os resultados obtidos com estudos populacionais (adultos) realizados por NAOUM (1997), verifica-se que a incidência deste autor para HbAS foi de 2,10%. Resultado bastante próximo do aqui obtido. Aquele mesmo autor verificou, no mesmo trabalho, uma incidência de 0,50% para HbAC. Neste caso obtivemos uma incidência quatro vezes maior. Gostaríamos de salientar que a amostragem do presente estudo foi relativamente pequena e que a incidência verificada no NUPAD tem mostrado um aumento na HbAC em relação a outros estudos populacionais. No NUPAD, em estudo realizado no período de Março de 1998 a Fevereiro de 1999, a incidência para HbFAC (futuro HbAC) foi de 1,167% e para HbFAS (futuro HbAS) foi de 3,096%.

A realização de testes visando a prevenção (medicina preventiva) na abordagem de recém-nascidos, hoje é possível, incluindo não somente hemoglobinopatias, mas também várias outras doenças. Ressaltamos aqui a triagem em hemoglobinopatias, não tão somente pela grande importância prática na condução de casos diagnosticados, mas principalmente pela possibilidade da realização de aconselhamento genético, que poderia ser estendido a familiares. E, talvez, o aconselhamento genético seja o ponto mais importante nesta abordagem, uma vez que esta medida realizada de forma adequada pode ser responsável pela prevenção na possibilidade de aparecimentos de novos casos.

A metodologia empregada neste trabalho é de execução bastante fácil. No comércio existem vários kits disponíveis para realização de eletroforese, tanto em pH ácido quanto pH básico. Estes apresentam custos mais elevados quando comparados com métodos que são desenvolvidos dentro do próprio laboratório. Assim, os procedimentos aqui apresentados

podem ser utilizados por laboratórios, como uma alternativa, para realização de eletroforese de hemoglobina em papel de filtro. Salientamos que a metodologia aqui empregada foi de "fabricação caseira" e quando comparada com EFIE mostrou ser plenamente confiável.

A realização da triagem de hemoglobinopatias pelo NUPAD é extremamente importante, apesar de não atingir 100% dos nascimentos de nossa região. Pela grande importância e pelo grande valor social seria de grande nota a extensão deste serviço a todas as regiões do Brasil.

O trabalho aqui desenvolvido pela sua execução estar ao alcance da maioria dos laboratórios e pela sensibilidade e especificidade alcançada quando comparando com EFIE, de custos mais elevados e ao alcance apenas de alguns Centros de Estudo ou Pesquisa, mostra de maneira mais simples uma possibilidade de realização de triagem de hemoglobinopatias em sangue colhido em papel de filtro de uma forma mais abrangente.

6 Referências Bibliográficas

- CAMINOPETROS J. (1938). *Researchsm on infantile erythrobaastic anemia in people of Eastern Mediterranean.* **Ann Med** ; 43:27, 43:104.
- COOLEY T.B. , LEE P. (1925). *Series of cases of splenomegaly in children with anemia and peculiar bone change.* **Trans Am Pediatr Soc**; 29:37.
- EMMEL V.E. (1917). *A study of the erythrocytes in case of severe anemia with elongated and sickle-shaped red blood corpuscles.* **Arch Intern Med**; 20:586.
- EMOND, A. M, COLLINS, R. & DARRIL, D. (1985). *Acute splenic sequestration in homoygous sickle cell disease: natural history and management.* **J Pedriatr**; 107:201-6.
- GARRICK MD et al. (1973): *Sickle Cell Anemia and other hemoglobinopathies: Procedures and strategy for employing spots of blood on paper as specimen.* **N England J Med** ; 288: 1265-1268.
- HAHN E. V. GILLESPIE E.B. (1927). *Sickle cell anemia.* **Arch Intern Med**; 39:586.
- HERRICK J.B.(1910). *Peculiar elongated and sickle-shaped red corpuscles in a case of severe anemia.* **Arch Intern Med**; 6:517.
- INGRAN V.M. (1956). *A specific difference between the globins of normal human and sicklecell anemia hemoglobins.* **Nature**; 178:792.
- NAOUM, P.C.(1987). **Diagnóstico das hemoglobinopatias.** São Paulo, S.P.: Sarvier.
- NAOUM,P.C.(1997). **Hemoglobinopatias e Talassemias.** São Paulo, S.P.: Sarvier.
- NEEL J.V. (1949). *The inheritance of sickle cell anemia.* **Science**; 110:64.

PAULING L, *et al.* (1949). *Sickle cell anemia, molecular disease*. **Science**; 110:543.

POWARS, D., OVERTURF, G. & WEISS, J. (1981). *Pneumococcal septicemia in children with sickle cell anemia: changing trend of survival*. **JAMA**; 245:1839-42.

RODAK B. F, *et al* (1995) **Diagnóctic Hematology** ,edition by, Philadelphia, Pensylvania Copyright.

SHERMAN I. J. (1940). *The sickling phenomenon, with special reference to the differentiation of sickle cell anemia from the sickle cell trait*. **Johns Hopkins Med J**; 67:309.

VICHINSKY, E., HURST, D.& EARLES, A.(1988). *Newborn screening for sickle cell disease: effect on mortality*. **Pediatrics**; 81:749-55.

WINTROBE, *et al.*(1940). *A familial hematopoietic disorder in Italian adolescents and adults*. **JAMA**; 114:1530.