

A influência dos mutantes de cadeia beta globina em heterozigose na fração glicada da Hemoglobina A

Claudia Regina Bonini Domingos¹

Paula Juliana Antoniazco Zamaro²

Claudia Augusta Hidalgo³

Carlos Roberto Valêncio⁴

Resumo:

A diversidade genética da população brasileira é refletida no fenótipo de variantes de hemoglobinas. A HPLC amplamente utilizada no diagnóstico laboratorial de hemoglobinopatias é ferramenta que permite a avaliação e presença de Hb A_{1c}. Foram avaliadas amostras de sangue periférico de 806 indivíduos adultos, de ambos os sexos e distintas origens étnicas por HPLC utilizando-se o Sistema automatizado VARIANT de HPLC com kit de diagnóstico para beta talassemia heterozigota. A análise estatística foi realizada pelo programa Excel e os achados globais por prospecção de dados. Nos portadores de globina beta alterada os valores de Hb A_{1c} foram significativamente menores que entre os indivíduos normais. Os resultados obtidos alertam para o cuidado na avaliação do perfil de hemoglobinas e das metodologias aplicadas à quantificação de Hb A_{1c}, tendo em vista variações nos valores desse marcador e incorreções nos parâmetros avaliados.

Palavras Chave: Hemoglobina glicada; Hb A1c; Banco de dados; Hemoglobinas variantes; prospecção de dados.

¹ Professora Doutora – Unesp - Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Departamento de Biologia – Laboratório de Hemoglobinas e Genética das Doenças Hematológicas; São José do Rio Preto, SP, Brasil; bonini@ibilce.unesp.br.

² Doutora – Prime Lab – Consultoria e Assessoria na área da Saúde - São José do Rio Preto, SP, Brasil;

³ Professora Doutora em Biotecnologia e Estatística – Centro Universitário de Rio Preto – UNIRP - São José do Rio Preto, SP, Brasil;

⁴ Professor Doutor - Unesp - Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Departamento de Ciências da Computação e Estatística; São José do Rio Preto, SP, Brasil.

Introdução:

A cromatografia da hemoglobina (Hb), descrita no final da década de cinquenta permitiu a observação de uma fração, de mobilidade mais rápida que a Hb A e que estava aumentada em diabéticos. Com o desenvolvimento das pesquisas foi possível caracterizar as alterações moleculares na Hb do adulto normal e o uso diagnóstico destas frações. A principal modificação da molécula de Hb no indivíduo adulto normal é a ligação não enzimática com a molécula de glicose e em menor extensão com metabólitos da glicose, alterando seu comportamento eletroforético e cromatográfico (DUTRIEU et al., 1985; SUMITA et al., 2003).

O adulto normal apresenta no sangue circulante Hb constituída por Hb A – maior componente; Hb A₂ e Hb F como componentes minoritários (BONINI-DOMINGOS, 2006). A Hb A é composta pela associação de subunidades alfa e beta globina formando o tetrâmero funcional ($\alpha_2\beta_2$). As moléculas de açúcar podem ligar-se a vários sítios na Hb produzindo várias formas de Hb glicada e as designações das frações são fundamentadas por processos cromatográficos e eletroforéticos (GOLDSTEIN et al., 1986; SUMITA et al., 2003).

A Hb A₀ representa a fração não glicada. A glicação em outros sítios que não o N-terminal da cadeia beta origina a Hb A₀ glicada que não apresenta modificação de carga. A glicação no N-terminal da globina beta origina uma sub fração de comportamento rápido denominada Hb A₁. A Hb A_{1c}, que representa 80% da Hb glicada presente na fração rápida, reflete a ligação da Hb com a glicose (PICHET et al., 1999). A figura 1 ilustra um esquema representativo do processo de glicação da Hb A.

A quantificação da Hb glicada é apontada atualmente como um marcador da glicemia média no indivíduo e de grande utilidade no controle de pacientes com *diabetes mellitus*, onde a glicação lenta da Hb reflete a quantidade de glicose disponível para a reação. Indivíduos com níveis elevados de glicose por longos períodos apresentarão uma maior proporção da sua Hb glicada. Sua quantificação representa valores médios e integrados para a glicemia no período de seis a oito semanas anterior a dosagem. A importância de sua quantificação

no monitoramento dos diabetes permitiu o desenvolvimento de metodologias cada vez mais precisas, sendo a HPLC a mais utilizada por sua eficiência e rapidez (LITTLE et al., 1983; DUTRIEU et al., 1985; SACKS, 2003).

No entanto existem interferentes na determinação da Hb glicada que devem ser considerados para os aspectos diagnósticos e terapêuticos. Destaca-se a presença de patologias que interferem na vida média do eritrócito diminuindo (anemia hemolíticas) ou aumentando (anemias ferropênicas) este período; as hemoglobinopatias e nefropatias crônicas (SACKS, 2003).

Com a diversidade genética da população brasileira, refletida nos diversos tipos de variantes de hemoglobinas objetivou-se avaliar o comportamento das frações glicadas em portadores de mutantes da globina beta em heterozigose, a partir do perfil cromatográfico obtido pelo sistema automatizado VARIANT de HPLC (Bio-Rad), amplamente utilizado para a determinação de fenótipos de hemoglobinas e que permite a separação da fração glicada e acetilada da Hb A.

Com as informações de grandes grupos populacionais e os valores numéricos gerados pela HPLC as ferramentas de bioinformática são úteis para identificação de determinados padrões. Nessas amostras foi utilizado um sistema de prospecção de dados com validação estatística dos valores obtidos na análise laboratorial.

Casuística e métodos:

Amostras de sangue periférico de 806 indivíduos adultos, de ambos os sexos e distintas origens étnicas, colhidas após consentimento informado.

O perfil de hemoglobinas foi avaliado por HPLC utilizando-se o Sistema automatizado VARIANT de HPLC com kit de diagnóstico para beta talassemia heterozigota (Bio-Rad). A análise estatística foi realizada pelo programa Excel e os dados de visualização através do software *Fast Map* ? (BONINI-DOMINGOS, 2006).

Resultados e discussão:

Após a análise cromatográfica as amostras foram agrupadas segundo o perfil de hemoglobinas em: Hemoglobinas normais (466); talassemia beta heterozigota (78); Hb AS (161); Hb AC (60) e Hb AD (41). A figura 2 ilustra a distribuição da casuística, composta por indivíduos com Hb normais e portadores

de mutantes de globina beta em heterozigose, sendo estas as formas de hemoglobinas anormais mais freqüentes no Brasil (FERNANDES E BONINI-DOMINGOS, 2006).

A avaliação dos perfis cromatográficos no sistema VARIANT permite a separação e quantificação das Hb normais e anormais e das frações derivadas da Hb A₀, as Hb A_{1c} e Hb A acetilada identificadas como P2 e P3 respectivamente pelo sistema. A figura 3 ilustra cromatogramas obtidos neste sistema automatizado com a diferenciação dos tipos de hemoglobinas.

A influência das alterações de hemoglobinas na quantificação da fração glicada tem sido amplamente discutida, em especial quando se utiliza sistema cromatográfico menos sensível. A HPLC, especialmente desenvolvida para a quantificação de Hb A_{1c}, evidencia um aumento da porção glicada na presença de variantes de hemoglobinas, em especial dos mutantes de cadeia beta globina.

Nas amostras por nós avaliadas, em sistema de HPLC utilizado para diagnóstico de hemoglobinopatias, foram observadas diferenças nos picos P2 e P3. A análise descritiva dos dados numéricos obtidos foi realizada e mostrou resultados médios diminuídos para P2 e P3 nas variantes mutantes de globina beta em heterozigose e, valores próximos dos normais em portadores de talassemias do tipo beta heterozigota (GOLDSTEIN et al., 1986; SUMITA ET AL., 2003; ONDEI et al., 2005). A tabela 1 ilustra os valores de P2 e P3 obtidos na estatística descritiva e a figura 4 a distribuição destes valores numéricos obtidos para cada hemoglobina anormal comparadas com os perfis de Hb normais.

Os achados laboratoriais e estatísticos permitiram a inserção das informações em base de dados de informática para visualização em 3D e análise do comportamento destes diferentes fenótipos corroborando a análise inicial.

Conclusão:

Como a glicação da globina beta mutante pode criar formas alternativas de frações de hemoglobinas que poderiam interferir na identificação de variantes e nos valores de Hb A_{1c}, os resultados obtidos alertam para o cuidado na avaliação do perfil de hemoglobinas e das metodologias aplicadas à quantificação de Hb A_{1c}, tendo em vista variações nos valores desse marcador e incorreções nos parâmetros avaliados. Os dados da população brasileira aqui apresentados são compatíveis com os da população Européia e Norte Americana, nesse caso

especialmente em Afro-americanos. Esses achados corroboram a característica híbrida da população brasileira quanto à sua etnia.

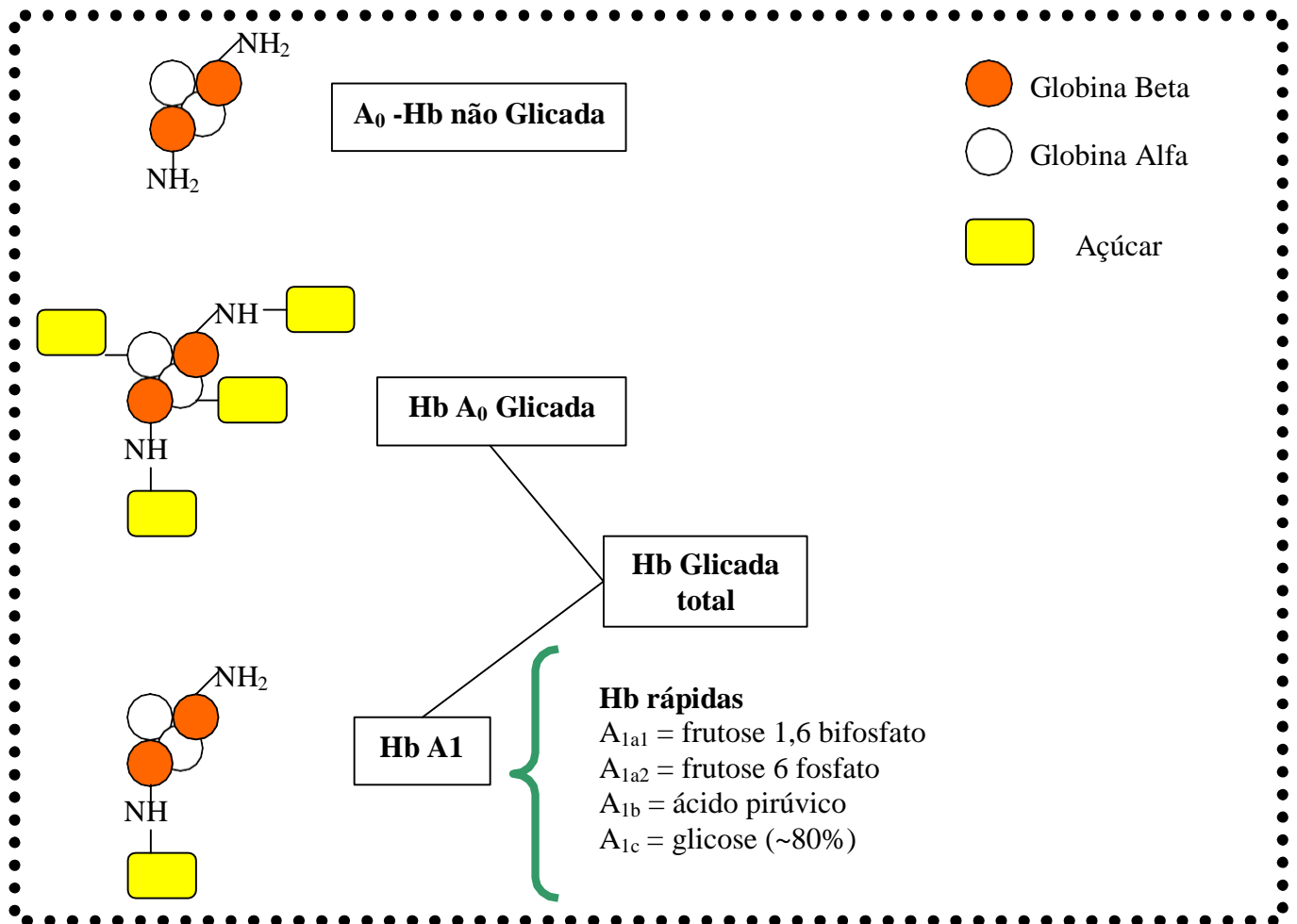


Figura 1: esquema representativo da glicação da Hemoglobina A.

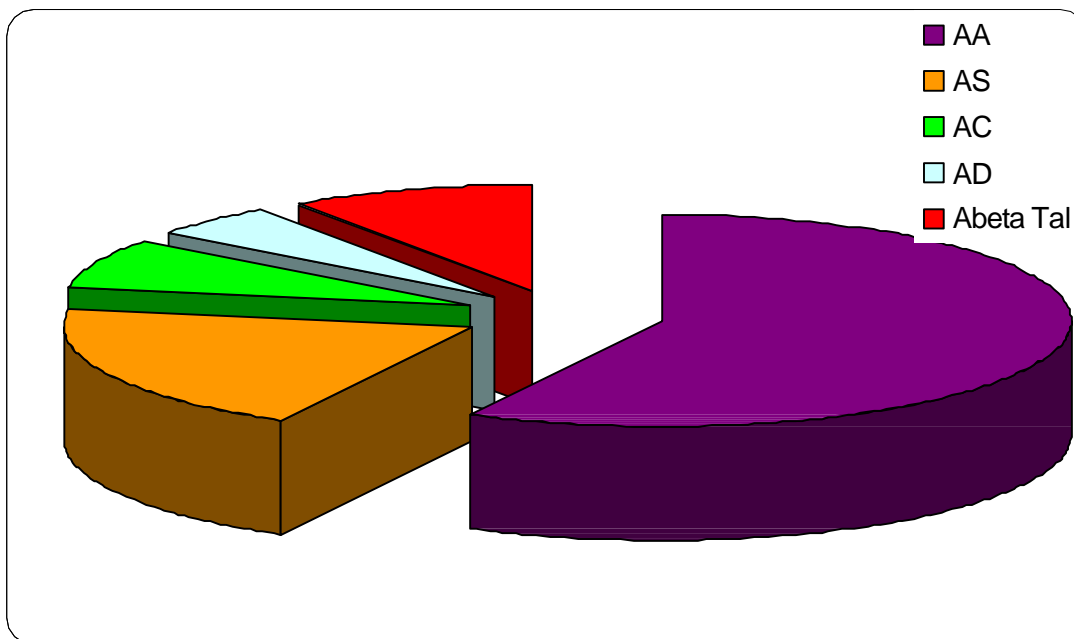


Figura 2: Fenótipos de hemoglobinas encontrados na amostragem avaliada por HPLC.

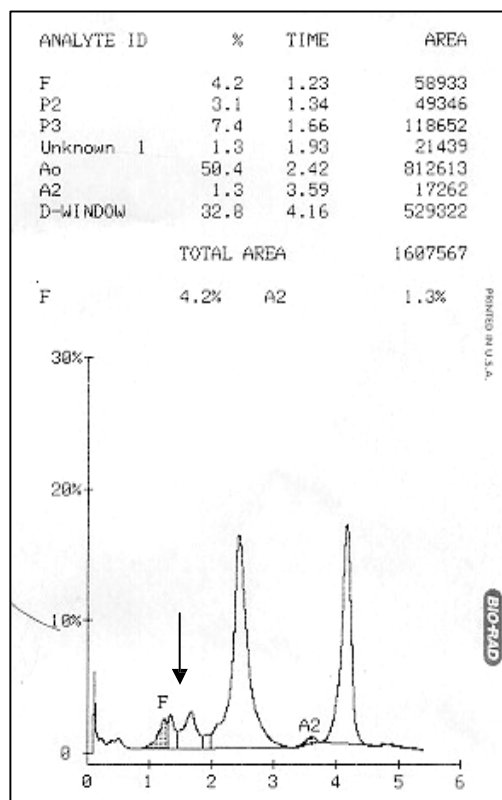
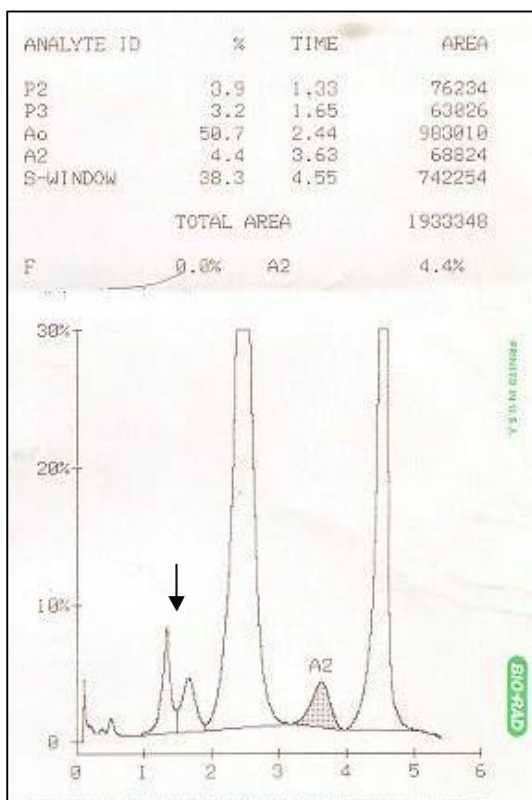


Figura 3: cromatogramas obtidos pelo sistema automatizado VARIANT para amostras com Hb AS (1) e Hb AD (2). A seta indica a fração glicada da hemoglobina.

Quadro 1. Análise estatística descritiva dos valores de P2 e P3 obtidos por HPLC nas amostras com hemoglobinas normais e anormais avaliadas.

P2 (%)	Normal	Beta tal	AS	AC	AD
Média	5,60	5,15	3,53	2,77	3,02
Mediana	5,60	5,10	3,50	3,20	3,60
Desvio padrão	0,79	1,01	0,68	1,48	1,84
Mínimo	2,40	0,00	1,40	0,00	0,00
Máximo	9,90	7,50	5,80	5,40	7,10
Total	466	78	161	60	41
P3 (%)	Normal	Beta tal	AS	AC	AD
Média	4,34	4,50	2,78	2,87	3,64
Mediana	4,00	4,20	2,50	2,90	3,10
Desvio padrão	1,31	1,21	1,11	1,64	2,27
Mínimo	2,10	2,50	0,80	0,10	0,00
Máximo	15,10	10,60	8,00	8,20	11,50
Contagem	466	78	161	60	41

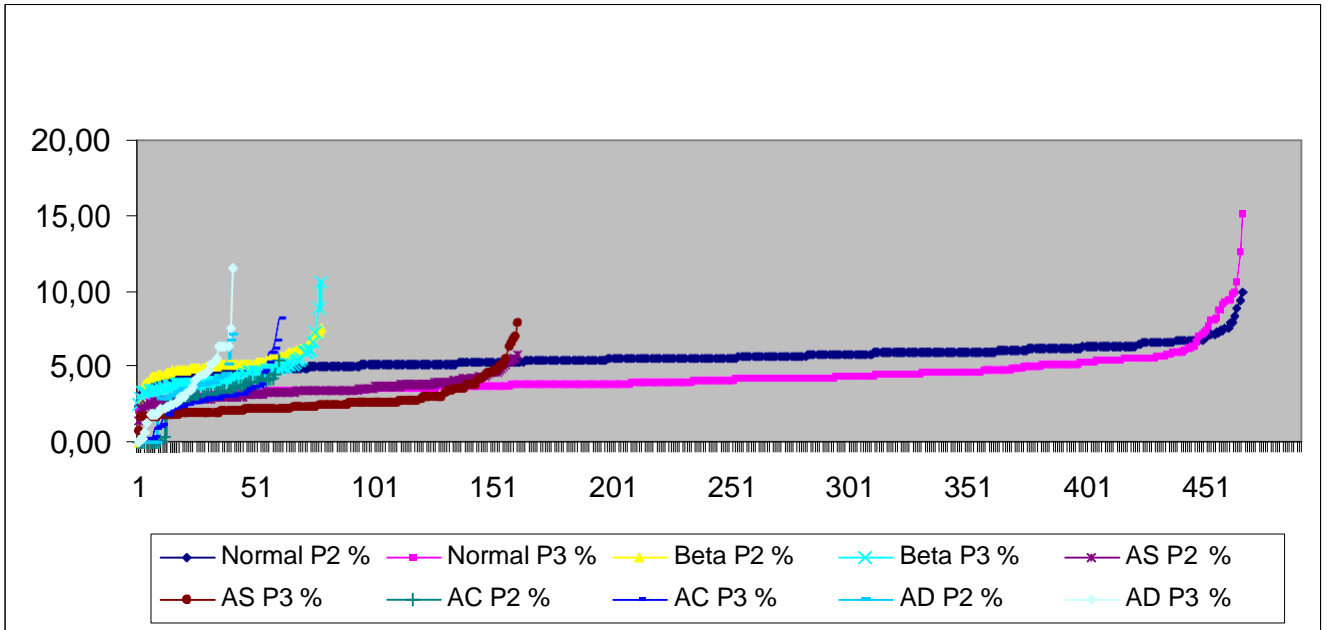


Figura 4: Distribuição dos valores de P2 e P3 nas amostras analisadas

Bibliografia:

- BONINI-DOMINGOS, C. R. **Metodologias Laboratoriais para o diagnóstico de hemoglobinopatias e talassemias**. 1. ed. São José do Rio Preto, SP: EditoraHN, 2006. v. 1. 121 p.
- DUTRIEU, J.; DELMONTTE, Y.A.; DELANNOY, P. Fast accurate determination of hemoglobin A1c using an automated sample processor. **Frezenius z anal. Chem.** V.321,p. 180 -184, 1985
- FERNANDES, A R C; BONINI-DOMINGOS, C. R. Metodologias laboratoriais para o diagnóstico de hemoglobinas variantes. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia** , Rio de Janeiro, Brasil, v. 28, n. 1, p. 65-70, 2006.
- GOLDSTEIN, D.E; LITTLE, R.R.; WIEDMEYER, H-M.; ENGLAND, J.D.; McKENZIE, E.M. Glycated hemoglobin: methodologies and clinical applications. **Clinical Chemistry**, v.32, n.10B,p. 64-70, 1986.
- LITTLE, R.R.; ENGLAND, J.D.; WIEDMEYER, H-M.; GOLDSTEIN, D.E. Effects of whole blood storage on results for glycosylated hemoglobin as measured by ion-exchange chromatography, affinity chromatography and colorimetry. **Clinical Chemistry**, v.29, n.6, p. 1113-1115, 1983.
- ONDEI, L S; ZAMARO, P J A; BONINI-DOMINGOS, C. R. A importância do Diagnóstico laboratorial clássico na identificação de variantes de hemoglobinas. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, Rio de Janeiro, RJ, v. 27, n. 1, p. 72-74, 2005.

BONINI-DOMINGOS, C. R.; ZAMARO, P. J. A.; HIDALDO, C. A. e VALENCIO, C. R.

PICHETH, G.; KIKUTI, M.Y.; JAWORSKI, M.C.G.; PINTO, A P. Hemoglobina glicada (Hb A1c): o que você precisa saber. **Revista Laes&Haes**, v.42, p.90-108; 1999.

SACKS, D.B. Hemoglobin Variants and hemoglobin A1c analysis: problem solved? **Clinical Chemistry**, v. 49, n. 8, p. 1245-1247, 2003.

SUMITA, N.M.; MENDES, M.E.; SOBREIRO JUNIOR, I.F. Papel do HPLC para dosagem da hemoglobina glicada no controle do diabetes melittus. **NewsLab**, n.57, p.184-193, 2003

The influence of beta globin chain mutant carriers in the glycated Hemoglobin fraction

Abstract:

The Brazilian population genetic diversity is reflected in hemoglobin variants phenotypes. The widely used HPLC in the hemoglobinopathies laboratorial diagnosis is a tool that allows to the evaluation and presence of Hb A1c. Peripheral blood Samples of 806 adult individuals, both sex, and distinct ethnic origins, had been evaluated for HPLC using the VARIANT automatic System with the thalassemia beta short diagnosis kit. The Excel program and, the global findings for data mining analysis carried out the statistics analysis. In the beta mutant carriers the values of Hb A1c had been significantly lower than the normal hemoglobin individuals. The results alert for the care in the hemoglobin profile evaluation and the applied methodologies to the quantification of Hb A1c, in special for variations in this disease marker values and in the evaluated parameters.

Key words: Glycated hemoglobin, Hb A1C; Data bases; variant hemoglobin; data mining

Correspondência para: Profa. Dra. Claudia Regina Bonini Domingos – Unesp - Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Departamento de

BONINI-DOMINGOS, C. R.; ZAMARO, P. J. A.; HIDALDO, C. A. e VALENCIO, C. R.

Biologia – Laboratório de Hemoglobinas e Genética das Doenças Hematológicas;
Rua Cristóvão Colombo, 2265, Jardim Nazareth, CEP: 15054 -000, São José do
Rio Preto, SP, Brasil. Fone/FAX: 17-3221-2392; email: bonini@ibilce.unesp.br