



ANÁLISE MOLECULAR DE CASOS DE DOENÇA DA HB H IDENTIFICADOS NO LABORATÓRIO DE HEMOGLOBINOPATIAS DO HC/UNICAMP DE 2002 A 2023

*Gisele Audrei Pedroso, Beatriz Benedetti de Oliveira, Ana Paula Milan Geraldo, Dulcineia Martins de Albuquerque, Susan Elisabeth Domingues Costa Jorge, Fernando Ferreira Costa, Magnun Nueldo Nunes dos Santos

Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)
Laboratório de Patologia Clínica (LPC) do Hospital de Clínicas da UNICAMP

gpedroso@unicamp.com.br*

Eixo 2

Introdução

As talassemias alfa (α) caracterizam-se pela síntese deficiente das cadeias globínicas α da hemoglobina (Hb), e são causadas, principalmente, por deleções que afetam um [alelo α^+ ($-\alpha$)] ou ambos [alelo α^0 ($--$)] os genes (*HBA1* e/ou *HBA2*) no genoma haplóide. A Doença da Hb H ocorre quando apenas um gene α encontra-se funcional (interação α^+/α^0). Assim, o excedente de cadeias beta (β) forma a Hb H (β_4), tetrâmero instável que causa anemia hemolítica moderada/grave.

Objetivo

Apresentar um recorte dos casos de Doença da Hb H caracterizados de 2002 até 2023 pelo Laboratório de Hemoglobinopatias do Laboratório de Patologia Clínica (LPC) do HC/Unicamp, referência no diagnóstico da talassemia α .

Metodologia

Na triagem protéica foram realizadas eletroforeses, HPLC e identificação da Hb H em esfregaço sanguíneo (Figura 1). Na caracterização molecular, as deleções/mutações foram rastreadas por *Multiplex-gap*-PCR, MLPA, análise de restrição, PCR alelo-específico e/ou sequenciamento direto (Figura 2).

Resultados

Foram identificados 32 casos de Doença da Hb H, em 27 famílias. Os alelos α^+ identificados: $-\alpha^{3.7}$, o mais frequente na população mundial (n=29), $-\alpha^{4.2}$ (n=1), uma mutação no sítio doador de *splicing* do primeiro íntron do gene *HBA2* e um caso envolvia Hb instável (Hb Icaria). Alelos α^0 resultaram de diferentes deleções extensas: do telômero com variações até o gene *SOX8* (225-1050kb) (n=8), $--^{SEA}$ (n=7), do elemento regulatório do *cluster* α (HS40) com variações até o gene *AXIN1* (15-175kb) (n=6), $--^{MED}$ (n=6), apenas no HS40 (n=3) e $-(\alpha)^{20.5}$ (n=2).

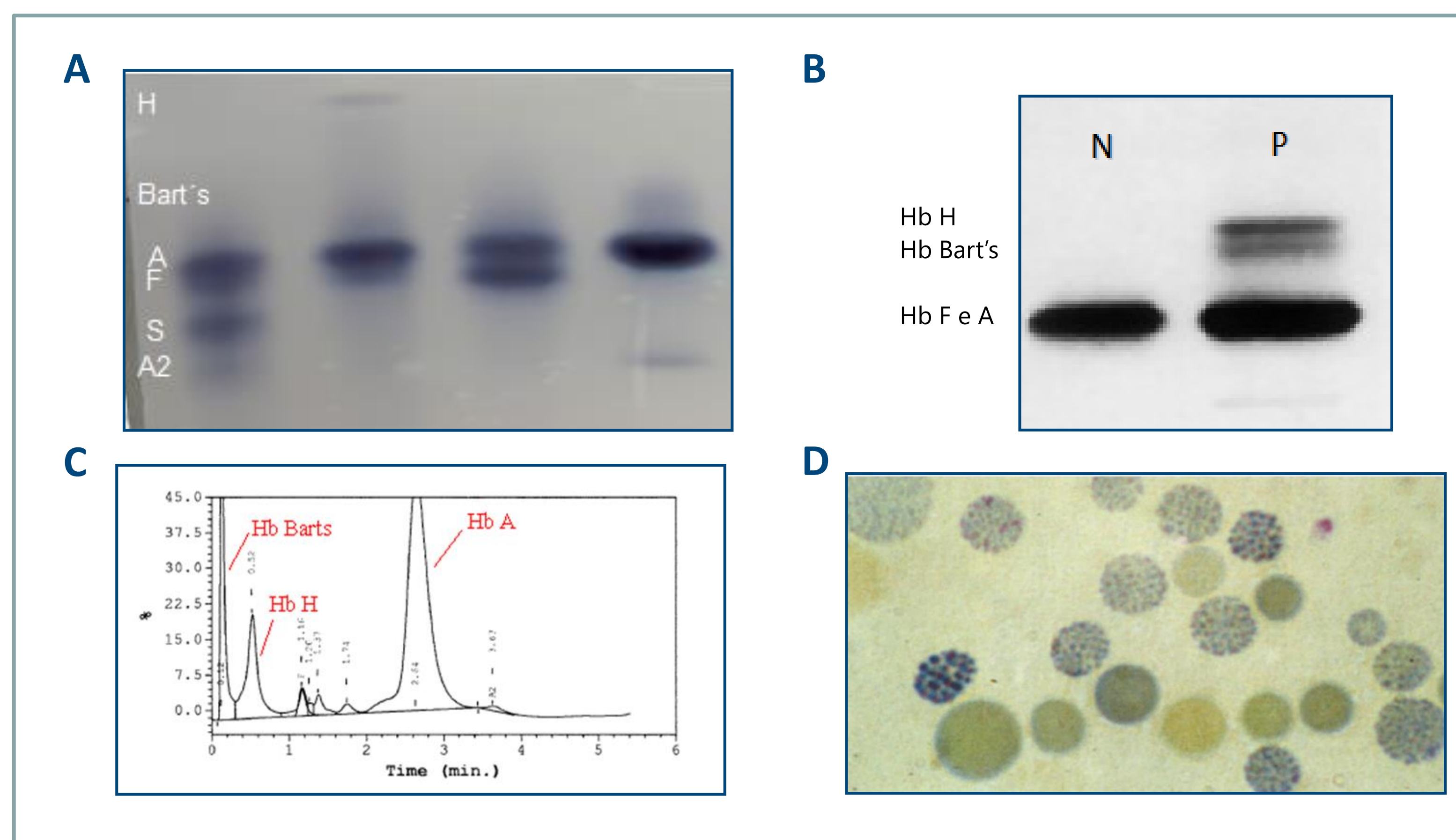


Figura 1. Eletroforese de Hb em acetato de celulose evidenciando a presença das Hb Bart's e Hb H, em pH alcalino (A) e pH neutro (B). HPLC de troca catiônica (Variant II, Bio-Rad) evidenciando a presença das Hb Bart's, Hb H e Hb A (C). Esfregaço de sangue periférico corado com Azul Brillhante de Cresil, evidenciando o aspecto de "bola de golfe" das hemácias na presença de inclusões de Hb H (D).

Conclusão

Esses resultados evidenciam a expressiva variabilidade de mutações α -talassêmicas em nossa população, e reforça a importância do diagnóstico preciso para uma assistência laboratorial de qualidade.

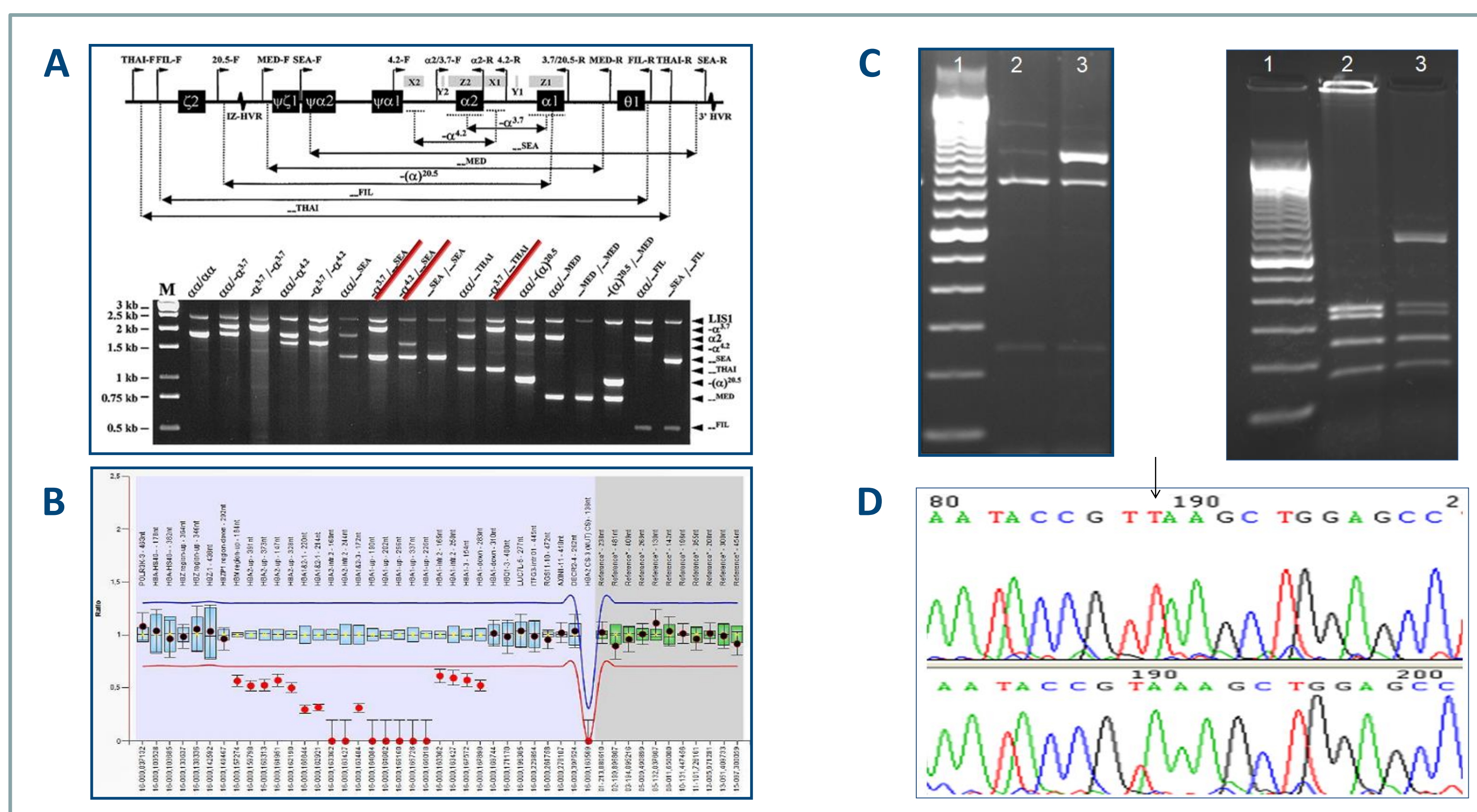


Figura 2. (A) *Multiplex-gap*-PCR: representação do *cluster* dos genes da globina α (acima); resultados com diferentes genótipos de α (abaixo), em vermelho exemplos de combinações alélicas que resultam em Doença da Hb H. (B) Gráfico gerado da análise por MLPA: o eixo x representa as sondas (Genbank NG_000006.1) e o eixo y a razão entre a intensidade das sondas da amostra testada e a intensidade média das amostras de referência (razão 1: presença de ambos os alelos / razão 0,5: perda em 1 alelo / razão 0: perda em ambos os alelos). Caso de Doença da HbH causado por deleção de 19 sondas em um alelo combinada à deleção - $\alpha^{3.7}$ no outro. (C) Géis de agarose 0,8%, resultados da digestão do gene da globina α com *NcoI* (esquerda) e *HphI* (direita): (1) Ladder 100pb (Invitrogen), (2) controle negativo e (3) controle positivo. (D) Sequenciamento direto (Sanger) dos genes da globina α . Acima, sequência normal do final do gene *HBA2* e abaixo uma mutação de ponto que resulta em uma variante instável (alelo α^+): Hb Icaria [$\alpha 2$ 142 Stop>Lys (HBA2:c.427T>A)] (eletroferograma gerado pelo software Chromas® versão 2.6.5); a seta indica o local da mutação, em hemizigose.