

# Hemoglobina S em Associação a Outras Variantes Raras: Estudos Funcionais e Correlações Clínico-laboratoriais

**Palavras-Chave:** Hb S, Hemoglobinopatias, Estudo funcional de hemoglobinas.

**Autoras:**

Larissa de Goes, Faculdade de Ciências Médicas - Unicamp

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Susan Elisabeth Domingues Costa Jorge (orientadora), Departamento de Patologia - Faculdade de Ciências Médicas - Unicamp

**Co-autoras:**

Dr<sup>ª</sup> Ana Paula Milan Geraldo - Centro Integrado de Pesquisas Oncohematológicas na Infância (CIPOI - Faculdade de Ciências Médicas/Unicamp)

Beatriz Benedetti de Oliveira - Hemocentro - Faculdade de Ciências Médicas/Unicamp

Gisele Audrei Pedroso - Laboratório de Patologia Clínica - Faculdade de Ciências Médicas/Unicamp

---

## INTRODUÇÃO:

A hemoglobina (Hb) humana é uma hemoproteína formada por dois pares de cadeias globínicas ( $\alpha$  e  $\beta$ ), cada uma com um grupo heme capaz de se ligar reversivelmente ao oxigênio (1). Hemoglobina normais incluem a Hb A1, a Hb A2 e a hemoglobina fetal (HbF) (2). No entanto, a hemoglobina humana apresenta mais de 1400 variantes genéticas descritas, a maioria resultante de mutações pontuais que alteram a sequência de aminoácidos das cadeias globínicas (3). Essas alterações estruturais podem ser clinicamente silenciosas ou interferir na função da molécula. Entre elas, destaca-se a Hb S — a variante mais comum — associada ao traço e à anemia falciforme, e a Hb Porto Alegre — uma variante rara, sobre a qual há poucas informações disponíveis na literatura (4). Contudo, alguns estudos sugerem que esta variante apresenta maior afinidade pelo oxigênio e leve redução da cooperatividade, sendo considerada clinicamente inócua (5).

Apesar de a Hb S ser assintomática em heterozigose, sua associação com outras variantes pode alterar a fisiologia da molécula e gerar manifestações clínicas, como a doença falciforme — condição caracterizada por hemólise crônica, episódios de vaso-oclusão e complicações sistêmicas decorrentes da deformação e enrijecimento das hemácias (6).

A alta prevalência da Hb S no Brasil, especialmente em populações afrodescendentes, associada à ampla variabilidade genética da população brasileira, cria um contexto propício para o surgimento de associações entre a Hb S e variantes raras de hemoglobina (7). Esse cenário justifica estudos que investiguem os efeitos funcionais e clínico-laboratoriais de combinações como a Hb S com variantes raras.

## OBJETIVOS:

- Realizar o levantamento dos dados clínicos e laboratoriais da Hb S em associação à Hb Porto Alegre;
- Estudar a interação Hb-O<sub>2</sub> da associação entre a Hb S e Hb Porto Alegre e comparar os resultados com os obtidos nos testes de função de cada uma dessas variantes em associação com a hemoglobina normal (Hb A).
- Correlacionar os resultados dos exames clínicos-laboratoriais e as interações Hb-O<sub>2</sub> observadas nos teste de função da Hb para a associação entre a Hb S e a Hb Porto Alegre.

## METODOLOGIA:

Amostras de sangue periférico foram coletadas em 4 tubos com EDTA do probando, identificado com Hb S e uma variante rara pela triagem neonatal (CIPOI/Unicamp), bem como de seus genitores, que apresentam Hb S ou a variante rara associada à Hb A. As crianças estão em acompanhamento no Centro Infantil Boldrini.

### 2.1. Purificação da Hemoglobina - cromatografias

As hemoglobinas foram extraídas após lavagem das hemácias com solução salina a 0,9%. Em seguida, as células foram lisadas com água deionizada e centrifugadas a 14.000 rpm por 15 minutos para a separação do estroma. Para a purificação dessas hemeoproteínas, foi realizada uma cromatografia de exclusão molecular nos pH 8,2 e 6,5 utilizando o polímero Sephadex G-25® (Sigma-Aldrich - Missouri, EUA), em tampão Hepes 50mM (sal hidrato de sódio Hepes ≥ 99% - titulação, Sigma-Aldrich - Missouri, EUA). Uma segunda purificação foi realizada por cromatografia de troca iônica (Amberlite® MB-20, Sigma-Aldrich - Missouri, EUA) com água ultrapura. Dessa forma, foi obtido o hemolisado total purificado (stripped), com pH 7,0, aproximadamente.

### 2.2. Estudo funcional das Hbs

O estudo funcional da amostra com Hb S + Hb Porto Alegre foi conduzido por testes espectrofotométrico-gasométricos, que medem oxi e desoxi-Hb em diferentes comprimentos de onda durante a oxigenação com concentrações conhecidas de O<sub>2</sub>. As curvas de dissociação Hb-O<sub>2</sub> foram realizadas em duplicatas. Os dados obtidos foram comparados com os resultados dos estudos funcionais das amostras dos dois progenitores.

A afinidade da Hb pelo oxigênio será medida por meio da obtenção da P50, que é a pressão de oxigênio necessária para saturar 50% das moléculas de Hb. A fim de determinar o efeito Bohr, essa medida foi realizada no pHs 6,5; 7,0; 7,5; 8,0 e 8,5, com e sem a presença de inositol-hexafosfato (IHP, 1mM), conforme a disponibilidade de amostras. A cooperatividade entre as cadeias globínicas (cooperatividade heme-heme) foi calculada através da constante de Hill (8). Devido à quantidade limitada de material biológico disponível no Biorrepositório, nem todas as condições experimentais inicialmente previstas puderam ser executadas.

### 2.3. Dados laboratoriais

Os valores de P50, Efeito Bohr e constante de Hill foram comparados descritivamente, devido ao baixo número de indivíduos analisados no estudo – abordagem comumente adotada em análises de variantes raras de hemoglobina.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO:

### 3.1. Análise Clínica:

GV (Contagem de Hemácias)	5,34 (x 10 <sup>9</sup> /µL)	(VR: 2,7-4,9x 10 <sup>9</sup> /µL)
HB (Hemoglobina)	13,7 (g/dL)	(VR: 9,0 - 14,0 g/dL)
HT (Hematócrito)	39,9 (%)	(VR: 28,0 - 42,0 %)
VCM (Volume Corpuscular Médio)	74,8 (fL)	(VR: 77,0 - 105,0 fL)
HCM (Hemoglobina Corpuscular Média)	25,6 (pg)	(VR: 26,0 - 34,0 pg)
RDW (Amplitude de Distribuição Eritrocitária)	17,9 (%)	(VR: H/M= 10,0 - 15,0%)

Tabela 1: Índices hematimétricos do Paciente com Hb S + Hb A

GV (Contagem de Hemácias)	3,16 (x 10 <sup>9</sup> /µL)	(VR: 2,7- 4,9 x 10 <sup>9</sup> /µL)
HB (Hemoglobina)	10,0 (g/dL)	(VR: 9,0 - 14,0 g/dL)
HT (Hematócrito)	26,0 (%)	(VR: 28,0 - 42,0 %)
VCM (Volume Corpuscular Médio)	82,5 (fL)	(VR: 77,0 - 105,0 fL)
HCM (Hemoglobina Corpuscular Média)	31,8 (pg)	(VR: 26,0 - 34,0 pg)
RDW (Amplitude de Distribuição Eritrocitária)	13,7 (%)	(VR: H/M= 10,0 - 15,0%)

Tabela 2: Índices hematimétricos do Paciente com Hb Porto Alegre + Hb A

GV (Contagem de Hemácias)	5,16 (x 10 <sup>9</sup> /µL)	(VR: 4,2-5,4 x 10 <sup>9</sup> /µL)
HB (Hemoglobina)	16,2 (g/dL)	(VR: 12,0 - 15,0 g/dL)
HT (Hematócrito)	46,8 (%)	(VR: 37,0 - 47,0 %)
VCM (Volume Corpuscular Médio)	90,8 (fL)	(VR: 80,0 - 99,0 fL)
HCM (Hemoglobina Corpuscular Média)	31,5 (pg)	(VR: 27,0 - 32,0 pg)
RDW (Amplitude de Distribuição Eritrocitária)	12,4 (%)	(VR: H/M= 10,0 - 15,0%)

Tabela 3: Índices hematimétricos do Paciente com Hb S + Hb Porto Alegre

**a) Paciente com Hb S + Hb A (progenitora):** Avaliação hematimétrica preservada, com hemoglobina e hematócrito normais. A discreta policitemia pode refletir compensação à menor oxigenação da Hb S. Leve microcitose, hipocromia e RDW elevado sugerem possível deficiência de ferro ou efeito da Hb anômala. O perfil é estável e típico do traço falciforme, sem manifestações clínicas. (Tabela 1)

**b) Paciente com Hb Porto Alegre + Hb A (progenitor):**

A avaliação hematimétrica do pai, heterozigoto para Hb Porto Alegre, revela quadro sem anemia. A hemoglobina está discretamente elevada, possivelmente refletindo adaptação à menor afinidade da variante pelo oxigênio. Demais parâmetros normais, com hemácias normocíticas, normocrômicas e RDW dentro dos padrões de referência. (Tabela 2).

**c) Paciente com Hb S + Hb Porto Alegre (probando):** A avaliação hematimétrica do probando com Hb S + Hb Porto Alegre mostra quadro sem anemia significativa. A contagem de hemácias está no limite inferior e o hematócrito ligeiramente reduzido, sugerindo discreta tendência à anemia. Índices corpusculares e RDW normais indicam hemácias preservadas. No conjunto, trata-se de um perfil estável, compatível com fenótipo leve (Tabela 3).

### 3.2. Estudo Funcional

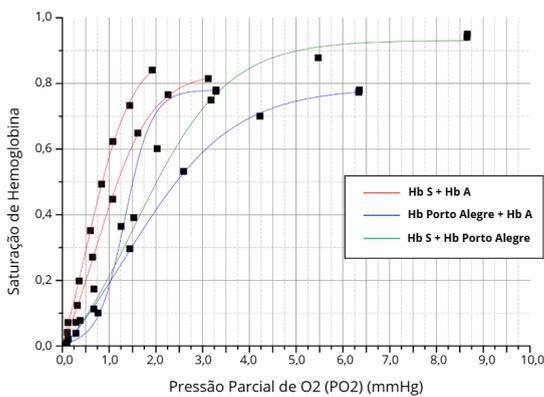


Figura 1: Curva de dissociação da oxi-Hb no pH 6,5

A análise funcional da curva de dissociação da oxi-hemoglobina em pH 6,5 revelou diferenças marcantes na afinidade pelo oxigênio entre os três participantes. A progenitora com a Hb S em heterozigose apresentou maior afinidade com o oxigênio, com curva deslocada à esquerda, indicando retenção de O<sub>2</sub> em baixas pressões e risco de hipóxia tecidual. Já o progenitor com Hb Porto Alegre em heterozigose e o probando com a Hb Porto Alegre em associação à Hb S exibiram curva deslocada à direita, refletindo menor afinidade e maior liberação de O<sub>2</sub> aos tecidos (Figura 1).

O mesmo padrão foi observado nas demais curvas de dissociação. No pH 7,0, a hemoglobina S em heterozigose apresentou maior afinidade pelo oxigênio do que a Hb Porto Alegre em heterozigose (Figura 2). Já no pH 7,5, a Hb S em heterozigose também apresentou maior afinidade em comparação ao paciente com a associação Hb S + Hb Porto Alegre (Figura 3).

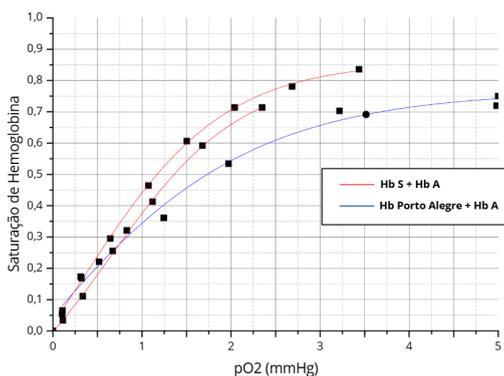


Figura 2: Curva de dissociação da oxi-Hb no pH 7,0

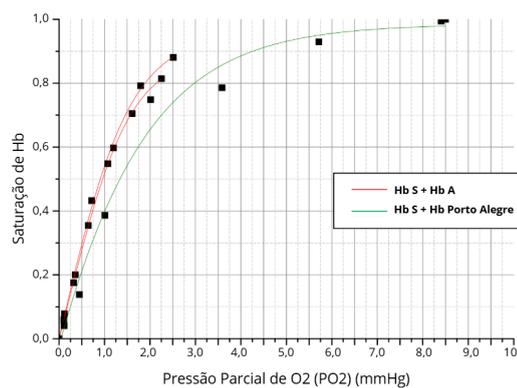


Figura 3: Curva de dissociação da oxi-Hb no pH 7,5

### 3.3. Análise da P50 e da Cooperatividade:

pH	Média da P50	Desvio Padrão da P50	Média da Cooperatividade	Desvio Padrão da Cooperatividade
6,5	1,181	-----	1,481	-----
7,0	1,183	-----	1,336	-----
7,5	0,933	0,040	1,447	0,074

Tabela 4: Valores de P50 e Cooperatividade do Paciente com Hb S + Hb A (stripped)

pH	Média da P50	Desvio Padrão da P50	Média da Cooperatividade	Desvio Padrão da Cooperatividade
6,5 (IHP)	43,383	4,507	1,653	0,521
7,0 (IHP)	36,885	1,054	1,586	0,030
7,5 (IHP)	22,788	0,076	1,839	0,175
8,5 (IHP)	7,743	-----	1,946	-----

Tabela 5: Valores de P50 e Cooperatividade do Paciente com Hb S + Hb A (IHP)

pH	Média da P50	Desvio Padrão da P50	Média da Cooperatividade	Desvio Padrão da Cooperatividade
6,5	1,972	0,655	1,525	0,139
7,0	1,745	-----	1,002	-----
6,5 (IHP)	42,125	10,059	1,582	0,499

Tabela 6: Valores de P50 e Cooperatividade do Paciente com Hb Porto Alegre + Hb A (stripped)

pH	Média da P50	Desvio Padrão da P50	Média da Cooperatividade	Desvio Padrão da Cooperatividade
6,5	2,037	-----	2,414	-----
7,5	1,362	-----	1,856	-----
8,5	1,274	-----	2,114	-----

Tabela 7: Valores de P50 e Cooperatividade do Paciente com Hb Porto Alegre + Hb S (stripped)

A análise dos valores absolutos de P50 evidencia que a amostra com Hb S + Hb Porto Alegre apresentou afinidade pelo oxigênio predominantemente reduzida em comparação às amostras dos controles. Em relação à cooperatividade, o probando mostrou valores moderadamente elevados (stripped: 2,414 em pH 6,5), superiores aos dos controles em todas as condições disponíveis, o que pode indicar uma interação heme-heme acentuada. Esses dados sugerem que a combinação das variantes Hb S e Hb Porto Alegre altera tanto a afinidade pelo oxigênio quanto a dinâmica de ligação cooperativa de forma distinta das heterozigoses isoladas.

### 3.4. Efeito Bohr:

O Efeito Bohr descreve a redução da afinidade da hemoglobina pelo oxigênio em pH ácido, promovendo maior liberação de O<sub>2</sub> nos tecidos. No gráfico pH versus log(P50) para amostras stripped (sem moduladores fisiológicos), observa-se a presença do Efeito Bohr em todas as combinações analisadas, evidenciado pela tendência de diminuição do log(P50) com o aumento do pH. Apesar de algumas alterações, não é possível afirmar, com segurança, que o Efeito Bohr possa estar afetado em amostras provenientes de heterozigotos compostos da combinação Hb S + Hb Porto Alegre.

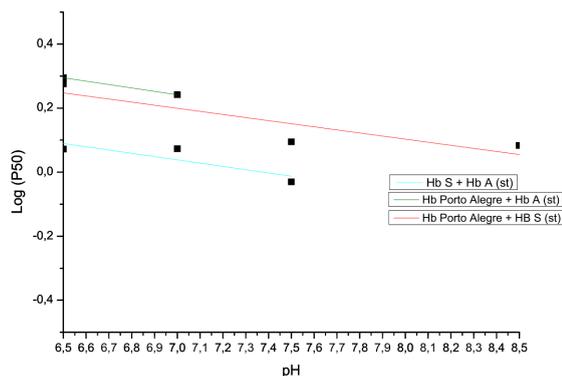


Figura 4: Gráfico pH x Log (P50) para amostras stripped

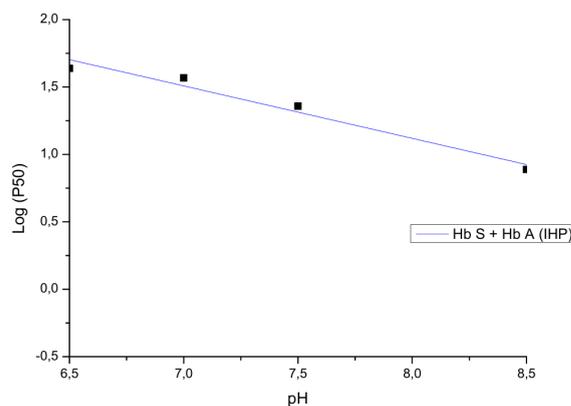


Figura 5: Gráfico pH x Log (P50) para amostras com IHP

## CONCLUSÕES:

Com base nos achados clínicos e funcionais, conclui-se que a associação Hb S + Hb Porto Alegre resulta em alterações discretas no perfil hematimétrico, compatíveis com um fenótipo sem complicações clínicas importantes. Já os estudos funcionais do hemolisado contendo a associação de variantes revelaram afinidade pelo oxigênio reduzida e cooperatividade aumentada, em relação às heterozigoses isoladas, o que poderia indicar alterações importantes, como uma maior propensão à polimerização nos heterozigotos compostos Hb S + Hb Porto Alegre. Esses resultados reforçam a importância de se investigar experimentalmente associações raras de hemoglobinas, mesmo quando

cada variante isolada possa não ser clinicamente relevante, visto que as diferentes combinações, em condições menos favoráveis podem resultar em complicações clínicas desconhecidas.

---

## BIBLIOGRAFIA

1. Jorge SE RD, Santos MNN SM. Hemoglobin: Structure, Synthesis and Oxygen Transport. Em: Sickle Cell Anemia. Switzerland: Springer International Publishing; 2016.
2. He R, Oliveira JL, Hoyer JD, Viswanatha DS. 24 - Molecular Hematopathology. Em: Hsi ED, organizador. Hematopathology (Third Edition) [Internet]. Philadelphia: Elsevier; 2018 [citado 28 de maio de 2023]. p. 712-760.e18. (Foundations in Diagnostic Pathology). Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780323479134000240>
3. Sabath DE. Molecular Diagnosis of Thalassemias and Hemoglobinopathies: An ACLPS Critical Review. Am J Clin Pathol. 1º de julho de 2017;148(1):6–15.
4. Bunn HF. Pathogenesis and treatment of sickle cell disease. N Engl J Med. 11 de setembro de 1997;337(11):762–9.
5. HbVar ID 236 [Internet]. [citado 6 de março de 2024]. Disponível em: [https://globin.bx.psu.edu/cgi-bin/hbvar/query\\_vars3?mode=output&display\\_format=page&i=236&.cgifields=histD](https://globin.bx.psu.edu/cgi-bin/hbvar/query_vars3?mode=output&display_format=page&i=236&.cgifields=histD)
6. Jorge SEDC, Petruk AA, Kimura EM, Oliveira DM, Caire L, Suemasu CN, et al. Hb S-São Paulo: A new sickling hemoglobin with stable polymers and decreased oxygen affinity. Arch Biochem Biophys. março de 2012;519(1):23–31.
7. Características Étnico-Raciais da População | IBGE [Internet]. [citado 28 de maio de 2023]. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/estatisticas/sociais/populacao/9372-caracteristicas-etnico-raciais-da-populacao.html>
8. Jorge SE, Bringas M, Petruk AA, Arrar M, Marti MA, Skaf MS, et al. Understanding the molecular basis of the high oxygen affinity variant human hemoglobin Coimbra. Arch Biochem Biophys. 1º de janeiro de 2018;637:73–8.