

HEMOGLOBINA E $\alpha_2 \beta_2^{26}$ GLUTÂMICO-LISINA (Hb E $\alpha_2 \beta_2^{26}$ Glu→Lis)

João Targino de ARAUJO (1), Valmíria Soares RIBEIRO (2), Marta Silveira e COSTA SILVA (2), José Cesar DE BONIS (3) e Rosa Alves Targino de ARAUJO (4)

RESUMO

Descrevemos uma família brasileira de ascendência indiana, com Hb E. Esta paciente tem um dos avós paternos natural da Índia e os avós maternos originários da Escandinávia, Suécia. A identificação desta hemoglobina permitiu elucidar a origem racial. A Hb E, que tem a mesma mobilidade da Hb C e O em pH alcalino, foi diferenciada desta pela eletroforese em ágar pH 6,2, segundo ROBBINSON¹⁸ onde a Hb E tem mobilidade similar à da Hb A₁. O estudo do "Fingerprinting" demonstrou tratar-se da Hb E $\alpha_2 \beta_2^{26}$ Glu Lys, como foi descrita por HUNT & col.¹⁶ e FRISCHER & col.⁸. Os dois casos estudados não apresentavam anemia e os pacientes levam vida normal.

INTRODUÇÃO

A Hb E está confinada ao sudeste asiático e não foi descrita, até o presente, em brasileiros de acordo com TARGINO DE ARAUJO²¹; SALZANO^{19,22} e NAOUM¹⁷. Dois casos foram descritos em pessoas de origem escocesa por VELLA & col.²³. A alta incidência da Hb E foi encontrada na Tailândia, sendo este o primeiro indício do seu significado antropológico. Desde então, pode-se estabelecer uma característica sobre seu padrão de distribuição; contudo, a mais alta frequência foi encontrada em Bruma¹³, Tailândia³ e Malaia^{3,14}; menores incidências foram descritas nas partes ocidental e sulina da Malaia, sul da Indonésia, ocidente de Bengala e oriente das Filipinas (LEHMANN¹³). A Hb E foi descrita nos Vedas⁹, na Malaia e Sião. Muitos milhares de chineses foram examinados e, até o presente, os resultados foram uniformemente negativos¹³. LIE-INJO LUAN ENG⁶⁻¹⁴ e LEHMANN¹⁵ encontraram numa comunidade da Indonésia incidência mais elevada que a habitualmente descrita para HbE. Este fato ainda não é concludente para se mo-

dificar o conceito de que a população da Indonésia tem baixa incidência de Hb E. Estes achados isolados de alta incidência no arquipélago indonês de Hb E, poderiam ser explicados usando-se as mesmas linhas para achados de ocorrências de anemia falciforme na Grécia⁷ ou Turquia¹.

Não se encontrou Hb E entre várias centenas de pessoas Nepalese-Ghorka, porém, VELLA citado por LEHMANN¹³ verificou a existência de alguns Ghorkas com Hb E em Singapura; esta observação não deve modificar a classificação dos Ghorkas como mongolóides sem Hb E, como tem havido exemplos genuínos entre famílias puramente inglesas, portuguesas e brasileiras com talassemia. Não se deve esperar, com a alta incidência de talassemia na Itália, Grécia e Turquia que alguns casos não deveriam surgir em outras partes do mundo, em pessoas de origem diferente da italiana; todavia, esses povos servirão como exemplo de populações sem talassemia.

Instituto de Medicina Tropical de São Paulo. Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar 470. 05403 São Paulo, Brasil

(1) Prof. Livre-Docente do Departamento de Clínica Médica. Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP

(2) Laboratório de Investigação de Hemoglobinas Anormais. Instituto de Medicina Tropical de São Paulo

(3) Farmacêutico Bioquímico

(4) Médica voluntária do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo

É interessante mencionar que a talassemia é freqüente em regiões onde existe a Hb E e, que a Hb A₂ está aumentada na talassemia e esta é indistinguível da Hb E pela eletroforese em papel ou em acetato; porisso, os trabalhos sobre os achados de Hb E terão de ser cuidadosamente selecionados para exclusão de possível talassemia.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram estudados dois membros desta família, pai e filha, ambos com Hb E associada à Hb A₁.

TABELA I
Estudo hematológico do pai e da filha com HbE

	Eritrócitos/mm ³	Hemoglobina g/100 ml	Hematócrito (%)	Reticulócitos (%)
K.L. (filho)	4.700.000	11.9	39	2.0
C.M.L. (pai)	5.000.000	14.5	42	1.5

A solução de hemoglobina foi preparada através da extração pelo clorofórmio e, a identificação das hemoglobinas foi feita pela eletroforese em acetato de celulose (tampão Tris-Glicina, pH 9,0) e a seguir em ágar (tampão Citrato, pH 6,2), segundo ROBBINSON¹⁸; a hemoglobina instável foi dosada pelo método desenvolvido por CARRELL & RAY².

A hemoglobina anormal foi identificada pela separação das cadeias de globina em cromatografia^{4,5} e acetato de celulose¹¹ e o "Fingerprinting" foi feito pela Unit Abnormal Haemoglobin of Cambridge University (Prof. H. Lehmann) e igualmente a análise sequencial mostrou que o ácido glutâmico foi substituído pela lisina, caracterizando a Hb E $\alpha_2 \beta_2^{26}$ Glu \rightarrow Lis.

A eletroforese de hemoglobina em acetato de celulose (Tabela II), tampão Tris-Glicina — pH 9,0 (Fig. 1); revelou a presença de uma hemoglobina mais lenta que a Hb S e com idêntica mobilidade eletroforética à das Hb C e Hb A₂; a eletroforese em ágar, tampão Citrato — pH 6,2 (Fig. 2), mostrou que a fração E migrou com a mesma mobilidade da Hb A₁, o que a distingue da fração C que, em idêntico meio, é mais lenta do que a Hb S de acordo com o estabelecido por MILNER¹⁶ (Fig. 3). A identificação foi baseada no estudo do "Fin-

O teste para hemoglobina instável revelou um pequeno precipitado de 1,0%, sendo esta quantidade normal para o método usado². O baço não foi palpado em ambos os casos, o que está de acordo com a descrição de SMITH²⁰. A fragilidade osmótica mostrou aumento da resistência dos eritrócitos e o estudo hematólogo revelou anemia moderada (Tabela I).

As amostras de sangue foram colhidas em EDTA. Os eritrócitos foram contados, automaticamente, no contador de células de Coulter e a hemoglobina foi determinada no hemoglobímetro digital da Coulter.

gerprinting" que mostrou ser uma variante da cadeia beta: B 8 resíduo 26 Glu-Lys.

TABELA II
Estudo eletroforético mostrando a porcentagem da Hb E

	C.M.L. (pai)	K.L. (filha)
Hb E (%)	27,5	28,0
Hb A ₁ (%)	71,5	70,0
Hb F (%)	1,0	2,0
Hb instável (%)	1,0	1,0

DISCUSSÃO

A hemoglobina E nunca foi encontrada no Brasil, porém é uma das mais comuns encontradas na Ásia³. Sua ocorrência foi estimada em cerca de 20 milhões de pessoas, sendo que a maior parte vive no sudeste asiático.

O estado homozigoto é caracterizado por uma anemia hemolítica média e, no sangue periférico se vêem muitas hemácias em alvo. O estado heterozigoto (HbE + HbA₁), como mostraram os dois casos descritos por nós, era assintomático e, no sangue periférico haviam raras hemácias em alvo. Este achado descrito na família indo-sueca, mostra através de sua identificação, a caracterização racial e sua dinâmica populacional.

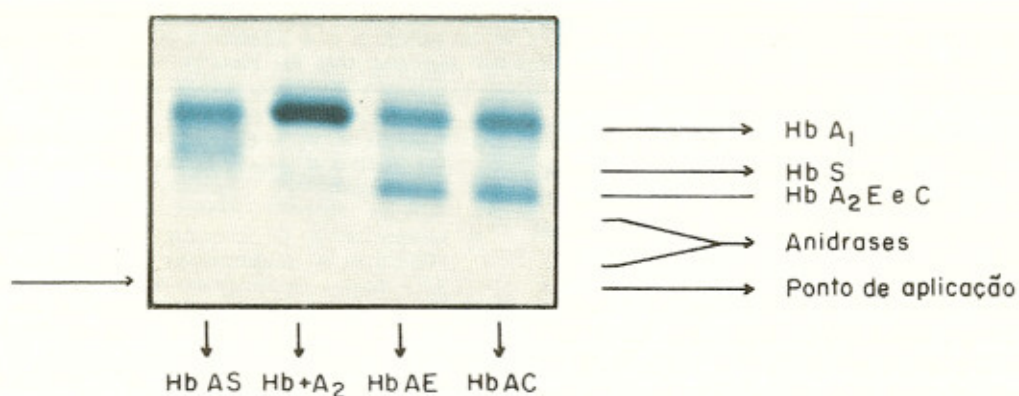


Fig. 1 — Eletroforese em acetato de celulose. Tampão Tris-glicina pH 9,0

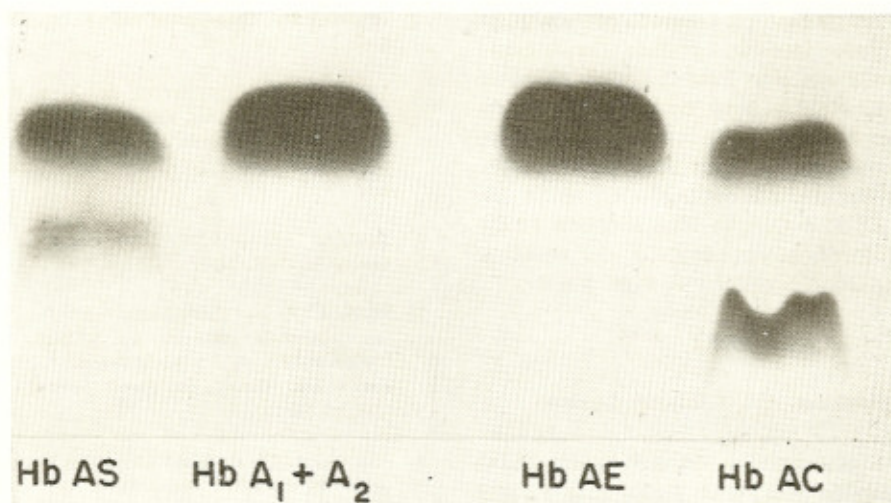


Fig. 2 — Eletroforese em gel de ágar, tampão citrato, pH:6,2

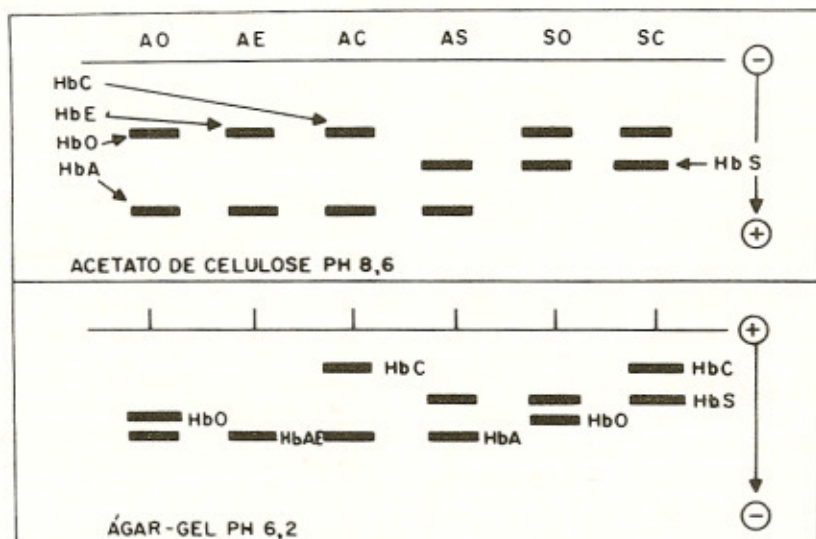


Fig. 3 — A Fig. 3 mostra que as mobilidades das hemoglobinas C, E e O são idênticas em acetato de celulose, enquanto que em ágar a Hb E tem a mesma mobilidade de Hb A e a Hb O migra mais lentamente que a Hb A, enquanto que a Hb C permanece próxima ao local de aplicação.

O diagnóstico chamou a atenção das possibilidades de confusão com a HbC ou HbA₂, porém, a eletroforese em ágar e a análise do "Fingerprinting" confirmaram o diagnóstico de HbE.

Um critério muito valioso na identificação desta hemoglobina é o postulado por MILNER¹⁶ — a eletroforese em acetato e ágar mostram claramente qual o procedimento ideal nesses casos e, com estes meios podemos distinguir a Hb O_{Arabia} da Hb C, ambas com idêntica mobilidade em acetato de celulose pH 9,0, principalmente pelo fato do grande contingente árabe existente em São Paulo, Brasil. O enunciado por MILNER¹⁶ deve constituir uma rotina, no procedimento laboratorial, na identificação de hemoglobinas anormais, pois oferece uma norma segura na distinção entre as hemoglobinas C, E e O, que têm idêntica mobilidade eletroforética em acetato de celulose (tampão Tris-Glicina pH 9,0 — Figs. 2 e 3).

SUMMARY

Hemoglobin E $\alpha_2\beta_2$ Glutamic-Lysine

We have described a family from India extraction, settled here, with HbE. This patient has one grandfather, a native from India and a grandmother from Sweden. The identification of this hemoglobin allows to acknowledge its racial origin.

The HbE has the same mobility of HbC and O in alkaline pH. It was differentiated from their by electrophoresis in pH 6.2 according to ROBINSON¹⁸ where HbE has similar mobility to HbA₁. The "Fingerprinting" assay identified Hb E $\alpha_2\beta_2^{26}$ Glu-Lys as described by HUNT¹⁰ and FRISCHER⁸.

These two cases did not slowan anemia and they have a normal life.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Prof. H. Lehmann pela realização do "Fingerprinting", permitindo a caracterização bioquímica da HbE.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AKSOY, M. — The hemoglobin E syndromes. I. Hemoglobin. *Blood* 15: 606-609, 1960.
2. CARREL, R. W. & KAY, R. — A simple method for the detection of unstable haemoglobin. *Brit. J. Haemat.* 23: 615, 1972.
3. CHERNOFF, A. I.; MINNICH, V.; NA-NAKORN, S.; TUCHINDA, S.; KASHEMSANT, C. & CHERNOFF, R. R. — Studies on hemoglobin E. I. The clinical, hematologic, and genetic characteristics of the hemoglobin E syndromes. *J. Lab. Clin. Med.* 47: 455-498, 1956.
4. CLEGG, J. B.; NAUGHTON, M. A. & WEATHERALL, D. J. — Abnormal human haemoglobins. Separation and characterization of the alpha and beta chains by chromatography, and the determination of two new variants, Hb Chesapeake and J (Bangkok). *J. Mol. Biol.* 19: 91-108, 1966.
5. CLEGG, J. B.; NAUGHTON, M. A. & WEATHERALL, D. J. — An improved method for the characterization of human haemoglobin mutants: identification of 22nd GLU, haemoglobin N (Baltimore). *Nature* 207: 945, 1965.
6. ENG, L. I. L. — A new haemoglobin in the Buginese *Lancet* II. 1338, 1957.
7. FESSAS, P. — Thalassemia and the alterations of the haemoglobin pattern. In: JONXIS, H. P. & DELAFRESNAYE, J. F., ed. *Abnormal Haemoglobins. A Symposium.* Oxford, Blackwell Scientific Publications 1959, p. 134-157.
8. FRISCHER, H. & BOWMAN, J. — Hemoglobin E, an oxidatively unlabel mutation. *J. Lab. Clin. Med.* 85: 531-539, 1975.
9. GRAFF, J. A. E.; IKIN, E. W.; LEHMANN, H.; MOURANT, A. E.; PARKIN, D. M. & WICKREMASINGHE, R. L. — Haemoglobin E and blood groups in the Vedas. *J. Physiol.* 127: 41P, 1955.
10. HUNT, J. A. & INGRAM, V. M. — Abnormal human haemoglobins. IV. The chemical difference between haemoglobins A and E. *Biochim. et Biophys. Acta* 49: 520-536, 1961.
11. KOMARMY, L. & BARNES, M. G. — Separation of globin chains by rapid cellulose acetate electrophoresis. *Amer. J. Clin. Path.* 58: 428-430, 1972.
12. LEHMANN, H. — Distribution of abnormal haemoglobins. *J. Clin. Path.* 9: 180-181, 1956.
13. LEHMANN, H. — Distribution of variations in human haemoglobin synthesis. In: JONXIS, H. P. & DELAFRESNAYE, J. F., ed. *Abnormal haemoglobins. A Symposium.* Oxford, Blackwell Scientific Publications, 1959, p. 202-215.
14. LEHMANN, H. & SINGH, R. B. — Haemoglobin E in Malaia. *Nature* 178: 695-696, 1956.
15. LEHMANN, H.; STORY, P. & THEIN, H. — Haemoglobin E in Burmese. *Brit. Med. J.* 1: 544-547, 1956.

16. MILNER, P. F.; PATH, M. R. C.; MILLER, C.; GREY, R.; SEAKINS, M.; DE JONG, W. W. & WENT, L. N. — Hemoglobin α Arab in four negro families and its interaction with hemoglobin S and hemoglobin C. *New Engl. J. Med.* 283: 1417-1424, 1970.
17. NAOUM, P. C.; CAMPOS, M. C. R.; PARENTI, M. F. & SZYMANSKI, A. M. — An improved electrophoretic method for a screening program for haemoglobinopathies. *Experientia* 36: 875-876, 1980.
18. ROBBINSON, A. R.; ROBSON, M.; HARRISON, A. P. & ZUELZER, W. W. — A new technique for differentiation of hemoglobin. *J. Lab. Clin. Med.* 5: 745-752, 1957.
19. SALZANO, F. M. — Hemoglobinas anormais na população negra de Porto Alegre. *Rev. Ass. Méd. Brasil.* 6: 157, 1960.
20. SMITH, C. H. & MILLER, D. R. — *Hematologia Pediátrica*. Barcelona, Salvat, 1975, p. 440.
21. TARGINO DE ARAUJO, J.; PLOWMAN, D.; ARAUJO, R. A. T.; SOUZA, L. F. & LEHMANN, H. — Haemoglobin J Rovigo 53 alpha (E-2) aspartic acid alanin. *Rev. Brasil. Pesq. Méd. Biol.* 13: 37-39, 1980.
22. TONDO, C. V. & SALZANO, F. M. — Abnormal hemoglobins in a Brazilian negro population. *Amer. J. Hum. Genet.* 14: 401-409, 1962.
23. VELLA, F.; LABOSSIERE, A.; WILTSHIRE, B.; LEHMANN, H.; SHOJANIA, A. M. & HILL, J. R. — The occurrence of hemoglobins E and E Sasakatoon in Central Canada. *Amer. J. Clin. Path.* 60: 314-318, 1973.

Recebido para publicação em 24/4/1981.