

ESTUDO DO PERFIL ELETROFORETICO DE HEMOGLOBINAS VARIANTES EM DIFERENTES TAMPÕES

CARVALHO, F. S. (1); PENNA, K. G. B. D. (2) ; BATAUS, L. A. M. (1)

Palavras - chave: hemoglobinas variantes, perfil eletroforético, acetato de celulose.

1. INTRODUÇÃO

Hemoglobinopatias são desordens hematológicas devido à alterações moleculares na estrutura genética de uma determinada hemoglobina. As hemoglobinopatias podem ser separadas em hemoglobinas variantes (Hemoglobina S, C e H) e talassemias (alfa ou beta). A eletroforese de hemoglobina em acetato de celulose é comumente executado para a caracterização deste tipo de doença. No pH alcalino, a hemoglobina é carregada negativamente, com isso, ela irá migrar para o cátodo. Hemoglobinas normais, como a A, A₂, e F são separadas umas das outras em bandas distintas. As hemoglobinas variantes como a hemoglobina S, por exemplo, irão se separar dessas hemoglobinas normais, em bandas distintas.

2. METODOLOGIA

Este projeto faz parte do projeto "Caracterização molecular das hemoglobinas variantes e talassemias em pacientes do LAS-CBB-UCG" que está sendo desenvolvido no Laboratório de Engenharia Genética do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de Goiás. As amostras serão de pacientes atendidos no laboratório escola do Departamento de Biomedicina da Universidade Católica de Goiás, a participação no estudo é voluntária e só será realizado mediante consentimento por escrito. O sigilo de todas as informações será assegurado pelos participantes da equipe de trabalho. O material utilizado para o estudo será o sangue obtido por punção venosa de veias periféricas e coletadas em tubo a vácuo ou em frascos estéreis contendo anticoagulante EDTA (etileno-diamino tetracético) a 10%.

MÉTODOS

Eletroforese de hemoglobina em pH alcalino:

- a) Solução hemolisante: Saponina 1% (Naoum, 1999).
Saponina PA 1,0 g e Água destilada qsp. 100,0 mL
- b) Suporte: acetato de celulose (Dolles)
- c) Tampão: Tris-EDTA-Borato segundo Marengo-Rowe, 1965.
Tris (hidroximetilaminometano) 14,5g (0,12 M), Ácido etilenodiaminotetracético 1,5g (0,005 M), Ácido Bórico 0,9g (0,015 M), Água destilada qsp.1000mL. Acertar o pH para 7,8, 8,0, 8,4 e 9,0.
- d) Tampão: Tris-EDTA-Borato segundo Naoum, 1999.
Tris (hidroximetilaminometano)10,2g (0,084 M), Ácido etilenodiaminotetracético 0,6g (0,002 M), Ácido Bórico 3,2g (0,052 M), Água destilada qsp.1000mL. Acertar o pH para 8,5.

- e)** Tampão: Tris-EDTA-Borato (1X) segundo Maniatis, 1989.
Tris (hidroximetilaminometano) 10,8g (0,090 M), Ácido etilenodiaminotetracético 4,0mL (pH8,0) (0,002 M), Ácido Bórico 5,5g (0,090 M), Água destilada qsp.1000mL. Acertar o pH para 8,2 e variar a concentração para 0,2X, 0,3X, 0,4X, 0,5X, 0,65X, 0,80X, 1,5X e 2,0X.
- f)** Tampão: Tris-EDTA-Borato (0,5X – alteração da concentração de ácido bórico em relação ao protocolo do Maniatis, 1989) – Tampão 1 Tris (hidroximetilaminometano) 5,4 (0,090 M), Ácido etilenodiaminotetracético 4,0mL (pH8,0) (0,002 M), Ácido Bórico 3,46 (0,090 M), Água destilada qsp.500mL. Acertar o pH para 8,2
- g)** Tampão: Tris-EDTA-Borato (0,5X - alteração da concentração de Tris (hidroximetilaminometano) em relação ao protocolo do Maniatis, 1989). – Tampão 2 - Tris (hidroximetilaminometano) 6,78 (0,090 M), Ácido etilenodiaminotetracético 4,0mL (pH8,0) (0,002 M), Ácido Bórico 2,75 (0,090 M), Água destilada qsp.500mL. Acertar o pH para 8,2.
- h)** Tampão: Tris-EDTA-Borato (0,5X - alteração da concentração de ácido bórico e de Tris (hidroximetilaminometano) em relação ao protocolo do Maniatis, 1989). - Tris (hidroximetilaminometano) 6,78 (0,090 M), Ácido etilenodiaminotetracético 4,0mL (pH8,0) (0,002 M), Ácido Bórico 3,46 (0,090 M), Água destilada qsp.500mL. Acertar o pH para 8,2.
- i)** Tampão: Tris- glicina (1X) (Maniatis, 1989) – Glicina (0,019 M) 14,26 g; Tris (0,025 M) 3,03 g. Água destilada qsp 1000ml. Acertar o pH para 8,7 e variar a concentração para 0,5X.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para realização deste trabalho a primeira etapa foi realizar uma eletroforese em acetato de celulose utilizando o tampão Naoum como padrão. Nessa eletroforese foram analisadas as migrações eletroforéticas das hemoglobinas A, C e S, as quais foram previamente testadas e confirmadas por cromatografia em HPLC.

Utilizando o tampão TEB, segundo Marengo em pH diferentes (7,8; 8,0; 8,4; 8,9 e 9,0.), observou-se uma menor separação entre as bandas eletroforéticas associadas as hemoglobinas A, C e S. Em todos os pH testados os resultados obtidos apresentaram menor separação em relação ao tampão de referência.

As eletroforeses utilizando o tampão TEB, segundo Maniatis 0,3X e 0,5X apresentaram uma melhor separação que a obtida com o tampão de referência. A maior separação foi obtida com tampão 0,3X, entretanto nessa condição ocorreu uma perda de nitidez na visualização das bandas eletroforéticas. Assim, definimos o tampão TEB, segundo Maniatis na concentração de 0,5X como o que apresentou melhor condição para separação e visualização das hemoglobinas testadas.

Realizamos também, a separação eletroforética utilizando o tampão TEB, segundo Maniatis, com modificações na concentração de cada composto da solução. Aumentamos a concentração apenas do ácido bórico (tampão 1), apenas do tris (tampão 2) e ambos componentes, ácido bórico e tris (tampão 3). Os resultados obtidos demonstraram que a variação da concentração dos componentes não permitiu uma separação eficaz das hemoglobinas testadas.

Enfim, quando utilizamos o tampão Tris-glicina, segundo Maniatis, observamos que a concentração 0,5X foi a que promoveu uma maior migração das hemoglobinas, porém, uma discreta separação entre as mesmas, quando comparado com o tampão TEB, segundo Naoum. Entretanto, estes resultados quando comparados

com o tampão TEB, segundo Maniatis a 0,5X, apresentou uma menor separação entre as hemoglobinas.

4. CONCLUSÃO

Concluimos que para a utilização da metodologia da eletroforese alcalina em acetato de celulose, o tampão TEB, segundo Maniatis na concentração de 0,5X foi o que apresentou melhores resultados, mostrando ser o mais eficiente na separação das hemoglobinas A, S e C.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BONINI-DOMINGOS, C. R.; BONINI-DOMINGOS, A. C.; CHINELATO, A. R.; ZAMARO, P. J. A.; CALDERAN, P. H. O. Interação entre HbC [beta6(A3) Glu>Lys] e IVS II-654 (C>T) beta-talassemia no Brasil. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*. v. 25, n. 2, p. 115-121, 2003.

MARENGO-ROWE, A. J. Rapid electrophoresis and quantification of haemoglobin on cellulose acetate. *Journal of Clinical Pathology*. v. 18, p. 790-792, 1965.

NAOUM, P. C. *Eletroforese. Técnicas e Diagnósticos*. 2ª Ed. São Paulo: Livraria Santos Editora, 1999. 154 p.

NAOUM, P. C. *Hemoglobinopatias e Talassemias*. São Paulo: Sarvier Ed. Livros Médicos, 1997. 171 p.

NAOUM, P. C.; FILHO, F. A.; DOMINGOS, C. R.; FERRARI, F. Hemoglobinas anormais no Brasil. Prevalência e distribuição geográfica. *Revista Brasileira de Patologia Clínica*. v. 23, p. 68-78, 1987a.

NAOUM, P. C.; DOMINGOS, C. R. B. Talassemias Alfa. *Laes & Haes*. v. 18, n. 107, p. 70-98, 1997.

NAOUM, P. C.; DOMINGOS, C. R. B.; MAZZIERO, P. A.; CASTILHO, E. M.; GOMES, C. T.; ÁLVARES-FILHO, F.; MORAIS, J. S.; ÂNGULO, I. L.; MATOS, L. C. "Você tem anemia Hereditária?" Resultados do programa de conscientização e detecção de hemoglobinas anormais em escolares de São José do Rio Preto, SP, Brasil. *Boletim da Sociedade Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*. v. 9, n. 143, p. 20-29, 1987b.

FERNANDES, A. R. C.; LEONELI, G. G.; CALDERAN, P. O.; OLIVEIRA, R. B.; SILVA-JR, W. A.; HIDALGO, C. A.; BONINI-DOMINGOS, C. R. Avaliação eletroforética, cromatográfica e molecular da HbD Los Angeles no Brasil. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*. v. 25, n. 3, p.161-168, 2003.

APOIO FINANCEIRO: PRPPG/UFG e CNPq

1) Universidade Federal de Goiás – Instituto de Ciências Biológicas II, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Laboratório de Bioquímica - Goiânia – GO

2) Universidade Católica de Goiás, Departamento de Biomedicina