

A dosagem de hemoglobina A₂ pode ser feita a partir de amostra de hemolisado com saponina ?

Could the saponin hemolysate be used for the hemoglobin A₂ dosage ?

Raimundo A. G. OLIVEIRA^{1*}
Fabiano P. FALCÃO¹
Maria do Socorro G. OLIVEIRA¹
Marilena OSHIRO²
Orlando C. de O. BARRETTO³

RIALA6/933

Oliveira, R. A. G. et al - A dosagem de hemoglobina A₂ pode ser feita a partir de amostra de hemolisado com saponina ?. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 62(1): 17 - 20 ,2003

RESUMO. A dosagem de hemoglobina A₂ (Hb A₂) é comumente feita utilizando-se como amostra solução de hemoglobina (hemolisado clássico com clorofórmio ou tetracloreto de carbono) ou hemolisados com saponina, apesar de os valores de referência para tal determinação terem sido estabelecidos a partir de dados tendo apenas solução de hemoglobina como amostra. Assim, para verificar se há ou não coerência na utilização indiscriminada daqueles valores de referência para dosagem de HbA₂ em amostras de hemolisado com saponina, foi feita a dosagem desta proteína utilizando quatro tipos de hemolisados. Na 1ª etapa da avaliação foram procedidas trinta determinações para fração de Hb A₂ a partir de hemolisado com saponina e hemolisado clássico com tetracloreto de carbono; na 2ª etapa mais 40 determinações foram analisadas utilizando hemolisado com saponina e com clorofórmio, porém acrescidos de cianeto de potássio (KCN). A análise estatística feita através de teste t pareado na 1ª etapa, revelou uma tendência de que os resultados obtidos a partir de saponina para amostras com níveis normais de HbA₂ sejam maiores cerca de 0,42% que aqueles obtidos a partir da solução de hemoglobina ($p < 0,001$). Porém, quando adiciona-se KCN no hemolisado não houve diferença significativa entre o hemolisado clássico (solução de hemoglobina) e o hemolisado com saponina. Deste modo, a utilização de diferentes tipos de hemolisados como amostra (saponina sem KCN ou solução de hemoglobina) podem gerar resultados distintos para a dosagem de HbA₂. Determinações de Hb A₂ feitas especificamente com hemolisado com saponina tendem a superestimar os resultados, quando comparados a valores de referência estabelecidos a partir de hemolisado clássico. Assim, a utilização do hemolisado clássico ou de saponina com KCN são indicados para a dosagem de Hb A₂ pelo método de eluição eletroforética. O uso de hemolisado apenas com saponina requereria a utilização de valores de referência específicos.

PALAVRAS CHAVE. Hemoglobina A; hemolisado; eletroforese; hemoglobinopatias.

¹ Universidade Federal do Maranhão

² Instituto Adolfo Lutz- São Paulo

³ LIM 23 - Instituto de Psiquiatria , Hospital das Clínicas da FM-USP

*Correspondência: e-mail: rago@usp.br

INTRODUÇÃO

A determinação dos níveis das diferentes frações de hemoglobinas é condição básica para o diagnóstico diferencial de muitas hemoglobinopatias⁵. Em um indivíduo normal estão presentes as hemoglobinas A (96-98%), A₂ (2,5-3,7%) e traços de hemoglobina fetal (0-1%)⁶.

A dosagem de hemoglobina A₂ (Hb A₂) é comumente feita utilizando-se como amostra solução de hemoglobina (hemolisado clássico com clorofórmio ou tetracloreto de carbono) ou hemolisados com saponina, apesar de os valores de referência para tal determinação terem sido estabelecidos a partir de dados tendo apenas solução de hemoglobina como amostra.

Dependendo do tipo de hemoglobinopatia, os níveis de hemoglobina A e fetal podem variar de modo bem amplo, como de zero à quase 100%. Para a hemoglobina A₂, entretanto, seus valores não se elevam ou decaem de modo tão grande, chegando apenas a valores de quase zero à no máximo 10%. Deste modo, sua determinação requer um bom controle de qualidade e a utilização de valores de referência apropriados⁵.

O diagnóstico laboratorial das hemoglobinopatias se faz através da caracterização laboratorial da presença de hemoglobinas anormais. Ao contrário das outras hemoglobinas, a HbA₂ tem de ser medida com considerável precisão e exatidão, porque o diagnóstico de algumas destas entidades clínicas, como por exemplo as β talassemias menores pode depender de um valor de HbA₂ somente 1 a 2% acima do intervalo de referência³.

Embora os protocolos técnicos particularizem o tipo de amostra a ser usado para a determinação da hemoglobina fetal (HbF), onde só deve ser feita a partir de hemolisado clássico - solução de hemoglobina - (obtido a partir de clorofórmio ou tetracloreto de carbono), esta restrição não ocorre necessariamente para dosagem de HbA₂. Deste modo, nosso trabalho se propôs a estudar a possibilidade de uso do hemolisado com saponina para a dosagem da HbA₂.

MATERIAL E MÉTODOS

Uma vez que não há diferenças entre os níveis de hemoglobinas A, A₂ e fetal em amostras de indivíduos acima dos 6 meses de idade, não anêmicos e com hemoglobinas normais, todas as amostras incluídas em nossa casuística eram de indivíduos com mais de 2 anos de idade, que apresentavam níveis de hemoglobina acima de 13 g/dl, padrão eletroforético normal à eletroforese alcalina em pH 8,6, bem como valores normais para o VCM, HCM e CHCM obtidos por automação e sem alterações na morfologia eritrocitária e no teste de resistência osmótica em NaCl a 0,36%.

Em uma 1ª etapa foram analisadas 30 amostras de sangue periférico de crianças com mais de 2 anos, de Creches do município de São Luís, MA. Na 2ª etapa, 40 amostras de sangue periférico de adultos de Centros de Saúde da cidade de São Paulo, SP.

Na 1ª etapa, as amostras foram alíquotadas em duas partes onde para cada uma foi realizado o preparo dos hemolisados pelos seguintes protocolos:

Protocolo 1: foi utilizado como reativo hemolisante uma solução de saponina a 1% (1g saponina qsp 100 ml de água destilada). Para amostras de sangue com hematócrito acima de 40% misturou-se 1 volume de sangue em 2 volumes de reativo hemolisante. Para amostras com hematócrito entre 30 e 40% misturou-se 1 volume de sangue em 1 volume de reativo hemolisante, como descrito por Naoum⁷. Homogeneizou-se e aguardou-se 5 minutos para a hemólise completa da mistura.

Protocolo 2: obtenção do hemolisado clássico (solução de hemoglobina) com tetracloreto de carbono. Centrifugou-se 2 ml da amostra a 1500 rpm por 5 min; removeu-se o plasma sobrenadante e lavou-se os eritrócitos por duas a três vezes com solução de NaCl a 0,85%; após última lavagem e centrifugação, desprezou-se o sobrenadante, adicionou-se um volume equivalente de água destilada, homogeneizou-se e completou-se com volume de tetracloreto de carbono equivalente ao do hemolisado formado; agitou-se vigorosamente o tubo de ensaio e centrifugou-se a 2000 rpm por 15 min. Retirou-se a camada superior correspondente à solução de hemoglobina.

Na 2ª etapa foi utilizado os protocolos **1**, porém à solução de saponina a 1% foi acrescido KCN a 0,01% e **2**, com substituição de tetracloreto de carbono por clorofórmio mais o acréscimo de KCN 0,05% ao hemolisado, na proporção de 2:1.

As dosagens de hemoglobina A₂ nas duas etapas foram realizadas pelo método de eluição eletroforética, descrito por Marengo- Rowe⁵.

RESULTADOS

Estão dispostas às tabelas 1 e 2.

Tabela 1 - Análise de teste t pareado entre as dosagens de HbA₂ tendo como amostras hemolisados com saponina versus hemolisado clássico obtido com tetracloreto de carbono.

n	Saponina Média(%)	Tetracloreto Média(%)	t	p
30	2,57	2,15	9,73	< 0,001

Tabela 2 - Análise de teste t pareado entre as dosagens de HbA₂ tendo como amostras hemolisados com saponina + KCN versus hemolisado clássico obtido com clorofórmio + KCN.

n	Saponina + KCN Média %	Clorofórmio + KCN Média %	t	p
40	2,66	2,62	0,607	0,547

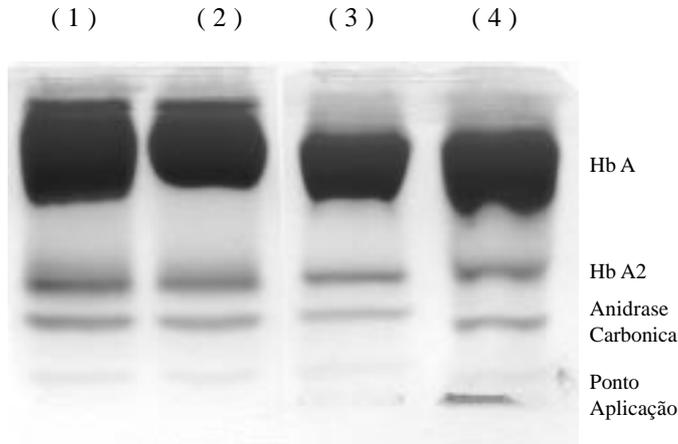


Figura 1 - Eletroforese alcalina de Hb em acetato de celulose, com diferentes tipos de hemolisados. (1) Clorofórmio; (2) Clorofórmio + KCN; (3) Saponina + KCN; (4) Saponina

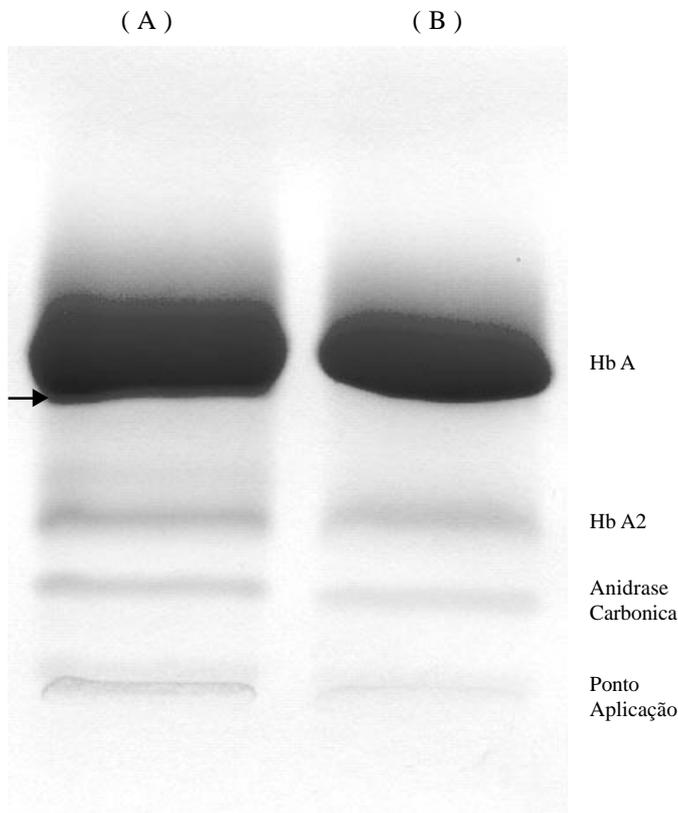


Figura 2 - Eletroforese alcalina de Hb em acetato de celulose com hemolisado clássico estocado. (A) com KCN; (B) sem KCN. A seta indica a metahemoglobina.

DISCUSSÃO

Os resultados obtidos à tabela 1, revelaram diferenças significativas (teste t, $p < 0,001$) quando foi utilizado hemolisado com saponina em comparação ao hemolisado clássico. Eles sugerem

haver uma tendência de que os valores obtidos para dosagem de hemoglobina A₂ a partir de hemolisado com saponina serem, em média, 0,42% maiores que aqueles obtidos por hemolisado clássico.

Além disso, todas as determinações (100%) obtidas na 1ª etapa pelo protocolo 1 (hemolisado com saponina) tiveram resultados maiores que aqueles obtidos pelo protocolo 2 (hemolisado clássico) reiterando a tendência de um grupo de resultados ser maior que o outro.

Os resultados obtidos na tabela 2, demonstram não haver diferenças nas dosagens de HbA₂ com hemolisado clássico, quando comparados ao hemolisado com saponina acrescido de KCN.

Essa diferença nos resultados, pode ser explicada, em parte, pela inconveniência da saponina pura em deixar no hemolisado o estroma celular, juntamente com membrana, proteínas e outras debris. Isto dificulta, tanto a entrada das hemoglobinas nos poros da fita de acetato de celulose, como também, a corrida da amostra no campo elétrico. De modo que os cortes das frações A e A2 ficam comprometidos, mesmo com uma boa aplicação da amostra por parte do operador (Fig.1, amostra 4). Além disso, a instabilidade molecular e a formação de metahemoglobina em amostras estocadas também pode causar uma separação menos definida entre as bandas, prejudicando os cortes das frações¹. Porém, a presença de KCN na solução de saponina estabiliza a hemoglobina em cianometahemoglobina (HbCN)¹, eliminando essas alterações moleculares, definindo com mais clareza as bandas eletroforéticas (Fig.1, amostra 3), de modo que quando comparadas com o hemolisado clássico + KCN (Fig.1, amostra 2), não houve diferença significativa entre eles na quantificação de HbA₂.

O hemolisado clássico + KCN tem grande vantagem nos hemolisados clássico sem KCN quando é utilizada em amostras estocadas, pois a metahemoglobina formada durante a estocagem pode ser convertida em cianometahemoglobina pelo KCN (Fig.2). De modo que as bandas ficam bem definidas e nítidas, semelhantes às amostras não estocadas (frescas).

Assim, os nossos resultados sugerem que para a determinação de HbA₂ é mais prudente a utilização de hemolisado obtido através de tetracloreto de carbono ou clorofórmio (hemolisado clássico) ou saponina com KCN. Para amostras estocadas, é mais coerente a utilização do hemolisado clássico acrescido de KCN. Somente nas amostras com suspeitas ou com diagnósticos de metahemoglobinemias, hemoglobinas instáveis e Hb M o uso de KCN deve ser utilizada com cautela.

CONCLUSÃO

A utilização de hemolisado obtido somente com a solução de saponina a 1% gera resultado distinto com o do hemolisado clássico na determinação quantitativa de Hb A₂, superestimando os valores.

Os hemolisados clássicos (tetracloreto de carbono ou clorofórmio) e o hemolisado com saponina + KCN demonstraram serem adequados para esta finalidade.

O uso de hemolisado apenas com saponina requereria a utilização de valores de referência específicos.

Oliveira, R. A.G. - Could the saponin hemolysate be used for the hemoglobin A₂ dosage ? **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 62(1): 17 - 20,2003.

ABSTRACT. It was made the evaluation of the hemoglobin A₂(Hb A₂) determination using four hemolysate types. In the 1st. stage of the evaluation thirty determinations were proceeded for fraction of Hb A₂ starting from hemolysate with saponine and starting from carbon tetrachloride, in the 2nd stage more 40 determinations were analyzed using hemolysate obtained through saponine and with cloroform, however added with potassium cyanide (KCN). The statistical analysis done through test t in the 1st , it revealed a tendency of the results obtained starting from saponine are larger about 0,42% that those obtained starting from carbon tetrachloride (p<0,001). However, when KCN is added in the hemolysate there is no significant difference among the classic hemolisado and with the saponine. Like this, the use of the classic hemolysate or of the saponine with KCN are indicative for Hb A₂ quantitative determination for the method of elution.

KEY WORDS: Hemoglobin A₂; hemolysate; hemoglobinopatias; electrophoresis.

REFERÊNCIAS

- 1- Brozovi'c, M. ; Henthorn, J. Investigation of anormal haemoglobins and thalassaemia. In: Dacie, J.V.; Lewis, S.M. **Practical Haematology**. 8th ed. London : Churchill Livinstone, 1995, p.249-286.
- 2- Fairbanks, V.F; Lee, G.G. Aspectos bioquímicos da hematologia. In: Burtis CA, Ashwood ER, **Tietz. Fundamentos de Química Clínica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. Cap. 36, p.681-706.
- 3- Lee, G.R et al. **Wintrobe: Hematologia Clínica**. São Paulo: Manole, 1998. Cap. 36, pág. 1120.
- 4- Lukens, J.N. Talassemias e Distúrbios Afins: Distúrbios Quantitativos da Síntese da hemoglobina. In: Lee, G.R. et al. **Wintrobe: Hematologia Clínica**. São Paulo: Manole, 1998. Cap. 39, p. 1206-1235.
- 5- Marengo-Rowe, A.J. Rapid electrophoresis and quantitation of humam haemoglobin on celuloze acetate. **J Clin Pathol**, 18: 790-792, 1965.
- 6- Mazza, U. et al. Clinical and Haematological data in 254 cases of beta-thalassaemias trait in Italy. **Br J Haematol** 33: 91-99, 1976.
- 7- Naoum, P.C. Hemoglobinopatias e Talassemias. São Paulo: Sarvier, 1997, pág 171.

Recebido em 14/06/2002 ; Aprovado em 13/03/2003