

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Farmácia (Fisiopatologia e Toxicologia)
Área de Fisiopatologia

Aplicação da proteômica na determinação da glicação A1C e na identificação de variantes de hemoglobina a partir de microamostragem volumétrica absorviva

Debora Araújo de Lima

Dissertação para a obtenção do Título de Mestre
Orientador: Prof. Dr. Valdemir Melechco Carvalho

São Paulo
2021

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Farmácia (Fisiopatologia e Toxicologia)
Área de Fisiopatologia

Aplicação da proteômica na determinação da glicação A1C e na identificação de variantes de hemoglobina a partir de microamostragem volumétrica absorviva

Debora Araújo de Lima

Versão corrigida

Dissertação para a obtenção do Título de Mestre

Orientador: Prof. Dr. Valdemir Melechco Carvalho

São Paulo

2021

Debora Araújo de Lima

Aplicação da proteômica na determinação da glicação A1C e na identificação de variantes de hemoglobina a partir de microamostragem volumétrica absorviva

Comissão Julgadora da
Dissertação para obtenção do Título de Mestre

Orientador: Prof. Dr. Valdemir Melechco Carvalho

1º examinador

2º examinador

3º examinador

São Paulo, _____ de _____ de 2022.

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

L732a Lima, Debora Araújo de
Aplicação da proteômica na determinação da glicação A1C e na identificação de variantes de hemoglobina a partir de microamostragem volumétrica absorviva / Debora Araújo de Lima. -- São Paulo, 2021.
168p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas - Programa de Pós-Graduação em Farmácia (Fisiopatologia e Toxicologia)
Orientador: Carvalho, Valdemir Melechco

1. Diabetes. 2. HbA1c. 3. Hemoglobina glicada. 4. Hemoglobinopatias. 5. Hemoglobinas variantes. I. T. II. Carvalho, Valdemir Melechco, orientador.

APOIO FINANCEIRO

Grupo Fleury - Projeto de desenvolvimento número 400816/CROM-2573.

Dedico este trabalho

À minha família, em especial à minha mãe Maria Cilene e avó Maria das Neves, por todo incentivo aos estudos desde criança e por sempre me apoiarem incondicionalmente em todos os meus sonhos, inclusive, durante a elaboração deste trabalho, sempre com muito amor, carinho e cuidado;

À minha irmã Maria Clara, por ser minha maior companheira e um dos maiores presentes já recebidos na vida;

Ao meu pai, pelo incentivo aos estudos desde criança.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus pelo dom da vida, proteção e tantas graças alcançadas.

À todos da minha família por serem meu principal alicerce, por me apoiarem e me incentivarem desde sempre a seguir meus sonhos e estudos.

Ao orientador Prof. Dr. Valdemir Melechco Carvalho por tantos ensinamentos, acolhida, disponibilidade e dedicação a longo da elaboração deste trabalho.

Ao Grupo Fleury pelo apoio financeiro / financiamento integral do projeto.

Ao setor de Pesquisa e desenvolvimento do Grupo Fleury, em especial ao grupo de cromatografia, pela acolhida, ensinamentos e amizades ao longo deste período.

À Dra. Karina Cardozo, pesquisadora do setor de Pesquisa e Desenvolvimento do Grupo Fleury pela revisão técnica deste trabalho, muitos ensinamentos e disponibilidade por toda ajuda.

Ao setor de Hematologia do Grupo Fleury, em especial à Simone Aparecida de Meira Zillig, Claudia Yoshie Kamei e Jonathan Wachtle por tanto auxílio com o projeto, nos estudos de casos, criação de uma hemoglobioteca de hemoglobinas variantes e hemoglobina glicada.

À coordenadora Nathalya Cristina Lavelle do setor de Cromatografia do Grupo Fleury, pelas dicas hematológicas, pela disponibilidade de ajuda, além do companheirismo, amizade e acolhida, desde a época do meu estágio em análises clínicas na empresa, contribuindo efetivamente com o meu amor às hemoglobinas.

À Dra. Carolina Tostes Pintão, por todo esclarecimento hematológico estritamente necessário para o curso deste trabalho.

À Dra. Milena Teles, por todo esclarecimento endocrinológico, estritamente necessário para o curso deste trabalho.

Ao setor de cromatografia do Grupo Fleury, pelo apoio e companheirismo ao longo desta jornada.

RESUMO

LIMA, D. A. **Aplicação da proteômica na determinação da glicação A1C e na identificação de variantes de hemoglobina a partir de microamostragem volumétrica absorviva**. 2021. 168f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

A hemoglobina glicada (HbA1c) é o principal marcador de controle glicêmico de longo prazo usado clinicamente no mundo, e seus valores estão diretamente associados à quantidade de glicose disponível na corrente sanguínea. Atualmente existem diversos métodos disponíveis para esta determinação, porém estes em menor ou maior grau possuem limitações, principalmente quando na presença de hemoglobinas variantes. Devido à sua alta especificidade, a espectrometria de massas tem alto potencial para reduzir as interferências apresentadas por outros ensaios na avaliação de marcadores sanguíneos. A aquisição independente de dados é um dos modos de aquisição da espectrometria de massas em tandem que permite uma cobertura abrangente do proteoma e tem o potencial de funcionar como um protocolo unificado para determinar uma infinidade de proteínas no sangue. Neste estudo, combinamos a aquisição independente de dados com microamostragem volumétrica absorviva e processamento de amostra proteômica automatizada como uma plataforma para realizar a determinação de marcadores clínicos. Avaliamos, como prova de conceito, dois biomarcadores clínicos relacionados à hemoglobina: hemoglobina glicada (HbA1c) e variantes de hemoglobina (Hbvar). Alcançamos o processamento da amostra em menos de 6 horas e a análise de espectrometria de massa otimizada exigiu 30 minutos. HbA1c por DIA mostrou boa correlação com o método de referência, mas a imprecisão do método não atendeu à especificação de imprecisão muito baixa para a avaliação clínica deste biomarcador. Uma estratégia para identificação de Hbvar foi desenvolvida com base em um banco de dados customizado combinado com um fluxo de trabalho para extração de dados DIA e avaliação rigorosa de peptídeos. Esta abordagem revelou Hbvars não identificados por métodos rotineiramente clínicos, como Hb Woodville e Hb Okayama. Usar o VAMS com um método de aquisição abrangente pode permitir a determinação de vários marcadores clínicos. Como poucas metodologias demonstraram aplicabilidade clínica do DIA, os resultados quantitativos e qualitativos apresentados aqui fornecem informações adicionais sobre sua força e deficiências para a rotina clínica. Os dados DIA estão disponíveis através do repositório Panorama via <https://panoramaweb.org/x5nqYH.url> (identificador do ProteomeXchange PXD029918).

Palavras-chave: Diabetes; HbA1c. Hemoglobina glicada. Hemoglobinopatias. Hemoglobinas variantes. Proteômica. Proteômica direcionada. Espectrometria de massas. Microamostragem volumétrica absorviva.

ABSTRACT

LIMA, D. A. **Application of proteomics in the determination of A1C glycation and identification of hemoglobin variants from volumetric absorptive microsampling.** 2021. 168f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

Glycated hemoglobin (HbA1c) is the main marker of long-term glycemic control used clinically and its values are directly associated with the amount of glucose available in the bloodstream. There are currently several methods available for this determination, but these to a lesser or greater extent have limitations, especially when in the presence of variant hemoglobins. Because of its high specificity, mass spectrometry has a high potential to reduce the interferences presented by other assays in the evaluation of blood markers. Data-independent acquisition (DIA) is one of the acquisition modes of tandem mass spectrometry that allows comprehensive proteome coverage, and it has the potential to work as a unified protocol to determine the multitude of proteins in blood. Here, we combined DIA with volumetric absorptive microsampling and automated proteomics sample processing as a platform to perform clinical markers determination. We evaluate, as a proof-of-concept, two hemoglobin-related clinical biomarkers: glycated hemoglobin (HbA1c) and hemoglobin variants (Hbvar). We achieved sample processing in less than 4 hours and optimized mass spectrometric analysis required 30 minutes. HbA1c by DIA showed good correlation with the reference method, but method imprecision did not meet the very low imprecision specification for the clinical evaluation of this biomarker. A strategy for Hbvar identification was developed based on a customized database combined with a workflow for DIA data extraction and rigorous evaluation of peptides. This approach revealed Hbvvars not identified by routinely clinical methods such as Hb Woodville and Hb Okayama. Using VAMS with a comprehensive acquisition method could enable the determination of multiple clinical markers. As few methodologies have demonstrated clinical applicability of DIA, quantitative and qualitative results presented here provides additional information about its strength and deficiencies for clinical routine. DIA data are available through the Panorama repository via <https://panoramaweb.org/x5nqYH.url> (ProteomeXchange identifier PXD029918).

Key words: Diabetes, HbA1c. Glycated hemoglobin. Hemoglobinopathies. Variant hemoglobins. Proteomics. Directed proteomics. Mass spectrometry. Absorbent volumetric microsampling.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μLC	<i>Micro liquid Chromatography</i> (microcromatografia líquida)
AmBic	Bicarbonato de amônio
ASO	Oligonucleotídeos específico de alelo
ARMS	Sistema de mutação refratária à amplificação
AS-PCR	PCR específica de alelo
BCL11A	Gene BCL11A
CV	Coeficiente de variação
CAP	<i>College of American Pathology</i> (Colégio Americano de Patologia)
CE	Eletroforese capilar
CI	Ionização química direta
CID	Dissociação induzida por colisão
DBS	<i>Dry Blood Spot</i>
DCCT	<i>Diabetes Control Clinical Trial</i>
DDA	<i>Data dependent acquisition</i> (Aquisições dependentes de dados)
DIA	<i>Data independent acquisition</i> (Análises independentes de dados)
DM	Diabetes Mellitus
DM1	Diabetes Mellitus tipo 1
DM2	Diabetes Mellitus tipo 2

DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DOC	Ácido deoxicólico
DTT	Ditiotreitol
ECD	Dissociação por captura de elétrons
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ESI	Ionização por eletrospray
ESI-MS	Ionização por eletrospray integrado a espectrometria de massas
ETD	Dissociação de transferência de elétrons
FA	Ácido fórmico
FASTA	<i>Fast all</i> (formato texto usado para representar sequências de nucleotídeos ou aminoácidos derivado do programa FASTA)
GHb	Hemoglobina glicada total
HbA	Hemoglobina adulta
HBA	Cadeia alfa de hemoglobina
HBA1	Gene codificante da cadeia alfa de hemoglobina
HBA2	Gene codificante da cadeia alfa de hemoglobina
HBAT	Gene codificante de hemoglobina embrionária
HBAZ	Gene codificante de hemoglobina embrionária
HbA0	Hemoglobina adulta sem glicação
HbA1a	Hemoglobina A1A

HbA1b	Hemoglobina A1B
HbA1c	Hemoglobina A1C
HBB	Gene codificante da cadeia beta de hemoglobina / Cadeia beta de hemoglobina
HBM	Gene codificante de hemoglobina embrionária
HbE	Hemoglobina E
HBE	Gene codificante de hemoglobina embrionária
HBD	Gene codificante da cadeia delta de hemoglobina
HbS	Hemoglobina S
HbD	Hemoglobina D
HbC	Hemoglobina C
HBG1	Gene codificante da cadeia gama de hemoglobina
HBG2	Gene codificante da cadeia gama de hemoglobina
HbH	Hemoglobina H
HbSC	Hemoglobina S e C em heterozigose
HbVar	Hemoglobina variante
Hct	Hematócrito
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> (cromatografia líquida de alta eficiência)
KLF1	Gene KLF1
IA	Iodoacetamida

IEX	<i>Ion Exchange Chromatography</i> (Cromatografia de troca iônica)
IEF	Eletroforese de focalização isoelétrica
IFCC	<i>International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine</i> (Federação Internacional de Química Clínica)
iTRAQ	<i>Isobaric tag for relative and absolute quantitation</i> (Marcação isobárica para quantificação relativa e absoluta)
LC-MS	<i>Liquid Chromatography coupled to Mass Spectrometry</i> (Cromatografia líquida integrada a espectrometria de massas)
MALDI	<i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization</i> (Dessorção/ionização a laser auxiliada por matriz)
MYB	Gene MYB
MLPA	Amplificação de sonda dependente de ligação multiplex
MRM	<i>Multiple Reaction Monitoring</i> (Monitoramento de reações múltiplas)
MS	<i>Mass Spectrometry</i> (Espectrometria de massas)
MS/MS	<i>Tandem Mass Spectrometry</i> (Espectrometria de massas sequencial)
<i>m/z</i>	relação massa/carga
NCE	<i>Normalized collision energy</i> (Energia de colisão normalizada)
NGS	Sequenciamento de nova geração
NGSP	<i>National Glycohemoglobin Standardization Program</i> (Programa Nacional de Padronização de Hemoglobina glicada)
nLC	<i>Nano liquid Chromatography</i> (nanocromatografia líquida)
OMS	Organização Mundial da Saúde

PCR	Reação em cadeia da polimerase
PPM	Parte Por Milhão
PTMs	<i>Post-Translational Modifications</i> (Modificações pós-traducionais)
PRM	<i>Parallel Reaction Monitoring</i> (Monitoramento de reação paralela)
PRTC	Calibração do tempo de retenção de peptídeos Pierce RT
SIM	<i>Selected Ion Monitoring</i> (Monitoramento de íon selecionado)
TFA	Ácido trifluoroacético
TEAB	Bicarbonato de trietilamônio
TMB	3,3',5,5'-tetrametilbenzidina
TPCK	6- (1-tosilamido-2-fenil) etil clorometil cetona
UKPDS	<i>United Kingdom Prospective Diabetes Study</i>
UPLC	<i>Ultra Performance Liquid Chromatography</i> (Cromatografia líquida de ultra eficiência)
SILAC	<i>Stable isotope labeling by amino acids in cell culture</i> (Marcação de isótopos estáveis em cultura de células)
SAX	<i>Strong anion-exchange</i> (forte troca aniônica)
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SWATH-MS	<i>Sequential Window Acquisition of All Theoretical Mass Spectra</i> (Aquisição de janela sequencial de todos os espectros de massas teóricos)
VAMS	<i>Volumetric Absorptive Microsampling</i> (Microamostragem absorptiva volumétrica)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Processos associados às reações de glicação não enzimática. Página 24.

Figura 2. Fasta da hemoglobina, subunidade beta com destaque no peptídeo N-terminal gerado a partir da digestão pela endoproteinase Glu-C. Página 60.

Figura 3. Protocolo de preparação de amostra padronizado segundo a Federação Internacional de Química Clínica (IFCC) para determinação da hemoglobina glicada HbA1c. Página 61.

Figura 4. Sequência FASTA da cadeia alfa da hemoglobina com destaque nos aminoácidos arginina (R) e lisina (K) clivados pela protease tripsina. Página 63.

Figura 5. Cromatogramas extraídos de aquisição independente de dados correspondentes às coordenadas de relação massa/carga dos peptídeos trípticos da cadeia alfa da hemoglobina. Página 64.

Figura 6. Sequência FASTA da cadeia beta da hemoglobina com destaque nos aminoácidos arginina (R) e lisina (K) clivados pela protease tripsina. Em vermelho, sinalizado o peptídeo N-terminal que contém a glicação. Página 64.

Figura 7. Cromatogramas extraídos de aquisição independente de dados correspondentes às coordenadas de relação massa/carga dos peptídeos trípticos da cadeia beta Hb. Página 65.

Figura 8. Cromatogramas extraídos de aquisição independente de dados correspondentes às coordenadas de relação massa/carga dos peptídeos trípticos N-terminais da cadeia beta hemoglobina -VHLTPEEK não glicado, com íons precursores do peptídeo e seus íons produtos. Página 66.

Figura 9. Cromatogramas extraídos de aquisição independente de dados correspondentes às coordenadas de relação massa/carga dos peptídeos trípticos N-terminais da cadeia beta hemoglobina -VHLTPEEK glicado, com íons precursores do peptídeo e seus íons produtos. Página 66.

Figura 10. Fluxo de trabalho para a identificação baseada na aquisição independente de dados de variantes de hemoglobina. Página 68.

Figura 11. Comparação entre espectros MS2 experimental (TPPcomet2) e predito (Prosit4). (A) HBB (VNVDEVGGEALGR, dupla carga, NCE = 30); (B) HBA (VGAHAGEYGAEALER, dupla carga, NCE = 30). Página 68.

Figura 12. Fluxo de trabalho para interpretação de dados obtidos por aquisição independente de dados na análise de variantes usando o Skyline. Página 70.

Figura 13. Identificação da variante Hasharon (UniProt HBAVAR002765). (A) Peptídeos trípticos da subunidade alfa da hemoglobina (HBA_HUMAN); (B) Abundância relativa dos peptídeos (em área) em diferentes amostras mostrando a diminuição relativa na área do pico para o peptídeo TYFPHFDLSHGSAQVK na amostra 60; (C) As áreas dos picos dos peptídeo individuais no Skyline representados no gráfico de comparação, que descreve a diminuição relativa na área de pico para o peptídeo TYFPHFDLSHGSAQVK na amostra 60; (D) Variantes da subunidade alfa da hemoglobina (detalhes de variantes na posição de sequência de 40 a 59); (E) As áreas de pico de peptídeo individual no Skyline replicam gráfico de comparação representando a detecção do peptídeo de íons precursores com carga dupla e tripla correspondente a TYFPHFHLHGSAQVK; (F) Cromatogramas extraídos de aquisição independente de dados para o precursor de carga dupla e tripla previsto e íons de produto correspondentes a TYFPHFHLHGSAQVK. Página 73.

Figura 14. Identificação da variante D-Los Angeles / D-Punjab / D-Portugal / D-Chicago / D-Oak Ridge (UniProt HBBVAR_003048). (A) Peptídeos trípticos da subunidade beta da hemoglobina (HBB_HUMAN); (B) As áreas dos picos dos peptídeo individuais no Skyline representados no gráfico de comparação, que descreve a diminuição relativa na área de pico para o peptídeo EFTPPVQAAYQK na amostra 51; (C) Variantes esperados da cadeia beta de hemoglobina (detalhes da variante na sequência de posição 120 a 131); (D) As áreas de pico de peptídeo individuais de Skyline replicam gráfico de comparação representando a detecção do precursor com carga dupla e íons de produto correspondentes a QFTPPVQAAYQK; (F) Cromatogramas extraídos de aquisição independente de dados para o precursor de carga dupla e tripla previsto e íons de produto correspondentes a QFTPPVQAAYQK. Página 74.

Figura 15. Identificação da variante Woodville (UniProt HBAVAR002727). (A) Variantes da subunidade alfa da hemoglobina (detalhes das variantes na posição da sequência de 1 a 7); (B) As áreas de pico do peptídeo individual Skyline replicam o gráfico de comparação que descreve a detecção do peptídeo de íons precursores com carga dupla correspondente a VLSPAYK na amostra 49; (C) Cromatogramas extraídos de aquisição independente de dados para o precursor de carga dupla previsto e íons de produto correspondentes a VLSPAYK; (D) As áreas de pico do peptídeo individual Skyline replicam o gráfico de comparação que descreve a detecção do peptídeo de íons precursores com carga dupla e tripla correspondente ao produto de clivagem perdida VLSPAYKTNVK; (E) Cromatogramas extraídos de aquisição independente de dados para o precursor com carga dupla e tripla prevista e íons de produto correspondentes ao produto VLSPAYKTNVK de clivagem perdida. Página 77.

Figura 16: Identificação da variante Okayama (HBBVAR002858). (A) Variantes beta da subunidade da hemoglobina (detalhes das variantes na posição da sequência de 1 a 8); (B) As áreas dos picos dos peptídeo individuais no Skyline representados no gráfico de comparação, que descreve a diminuição relativa na área de pico para o peptídeo VHLTPEEK; (C) Peptídeos trípticos da subunidade beta da hemoglobina (HBB_HUMAN) (detalhes na posição da sequência de 1 a 8); (D) As áreas de pico do peptídeo individual da Skyline replicam o gráfico de comparação que descreve a detecção do precursor com carga dupla e íons de produto correspondentes a VQLTPEEK; (E) Cromatogramas extraídos de aquisições independente de dados para

o precursor de carga dupla previsto e íons de produto correspondentes a VQLTPEEK. Página 78.

Figura 17. Cromatogramas extraídos de aquisição independente de dados correspondentes às coordenadas de relação massa/carga dos peptídeos trípticos N-terminais da cadeia beta hemoglobina. (A) íons precursores do peptídeo não glicado; (B) íons produtos do peptídeo não glicado; (C) íons precursores do peptídeo glicado; (D) íons produtos do peptídeo glicado. Página 81.

Figura 18. Avaliação da acurácia do método desenvolvido para a quantificação da hemoglobina glicada HbA1c empregando o software EP Evaluator. Página 82.

Figura 19. Avaliação da linearidade da metodologia por gráficos de dispersão dos valores. Página 83.

Figura 20. Avaliação da linearidade da metodologia. Página 84.

Figura 21. Avaliação do limite de quantificação do método desenvolvido para a quantificação da hemoglobina glicada HbA1c empregando o software EP Evaluator. Página 85.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Comparação entre a identificação de variantes de hemoglobina por eletroforese de zona capilar seguida por cromatografia líquida de troca catiônica (CZE/CX-HPLC) e cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas sequencial (LC-MS/MS) baseada em aquisição independente de dados. Página 76.

Tabela 2. Resultados das imprecisões obtidas do método desenvolvido de quantificação da hemoglobina glicada HbA1c em três concentrações diferentes. Página 83.

Tabela 3. Teste de estabilidade da hemoglobina glicada HbA1c em microamostragem absorviva volumétrica (VAMS) de sangue capilar, por 1, 3 e 10 dias. Página 86.

Tabela 4. Teste de estabilidade da hemoglobina glicada HbA1c em microamostragem absorviva volumétrica (VAMS) de sangue venoso, por 1, 3 e 10 dias. Página 87.

Tabela 5. Teste de estabilidade da hemoglobina glicada HbA1c em microamostragem absorviva volumétrica (VAMS) de sangue capilar e venoso, comparando condição de coleta de acordo com os dias 1, 3 e 10 dias. Página 88.

SUMÁRIO

RESUMO	08
ABSTRACT	09
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	10
LISTA DE FIGURAS	15
LISTA DE TABELAS	18
1. Introdução	22
1.1. Diferenciação e epidemiologia do diabetes mellitus.....	22
1.2. Hemoglobina glicada A1C.....	24
1.3. Determinação da HbA1c.....	26
1.3.1. Cromatografia de troca iônica (IEX).....	26
1.3.2. Cromatografia de afinidade.....	27
1.3.3. Eletroforese.....	28
1.3.4. Imunoensaio.....	29
1.4. Efeitos das principais hemoglobinas variantes nos testes comercializados para determinação da HbA1c.....	30
1.5. Programas de padronização da dosagem de HbA1c.....	31
1.6. Variantes de hemoglobina e hemoglobinopatias.....	32
1.6.1. Epidemiologia das hemoglobinopatias no Brasil.....	34
1.6.2. Diagnóstico das hemoglobinopatias.....	34
1.6.2.1. Hemograma completo.....	35
1.6.2.2. Cromatografia de troca iônica e eletroforese capilar.....	36
1.6.2.3. Eletroforese em gel.....	38
1.6.2.4. Diagnóstico molecular.....	38
1.6.2.5. Uso da espectrometria de massas na identificação de variantes de Hb.....	41

1.7.	Aquisição independente de dados (DIA).....	43
1.8.	Técnicas alternativas de amostragem de sangue.....	45
2.	Objetivos.....	48
3.	Materiais e métodos.....	49
3.1.	Reagentes e outros materiais.....	49
3.2.	Equipamentos.....	49
3.2.1.	Equipamentos básicos.....	49
3.2.2.	Sistema automatizado.....	50
3.2.3.	Cromatografia semipreparativa.....	50
3.2.4.	Sistema de nano cromatografia líquida acoplado a espectrômetro de massa e ionização nanoelectrospray (nLC-MS).....	50
3.3.	Amostras biológicas.....	50
3.4.	Métodos.....	52
3.4.1.	Preparação de amostra.....	52
3.4.1.1.	Protocolo IFCC para preparação de amostra.....	53
3.4.1.2.	Avaliação da tripsina como alternativa à endoproteinase Glu-C.....	54
3.4.2.	Análise por LC-MS/MS.....	54
3.4.3.	Teste de fracionamento dos peptídeos por cromatografia de troca aniônica..	55
3.4.3.1.	Análise das frações por DDA.....	56
3.4.4.	Processamento de dados: identificação de variantes de hemoglobina e criação de uma biblioteca FASTA.....	56
3.4.5.	Processamento de dados: quantificação de HbA1c.....	58
3.4.6.	Validação do método de quantificação por DIA.....	58
4.	Resultados e discussão.....	60
4.1.	Preparação de amostra alternativa ao protocolo IFCC.....	60

4.1.1. Avaliação da tripsina como alternativa à endoproteinase Glu-C e o uso de VAMS como alternativa à coleta de sangue venoso na preparação da amostra.....	61
4.2. Análise por LC-MS/MS.....	63
4.3. Teste de fracionamento dos peptídeos por cromatografia de troca aniônica para construção de uma biblioteca espectral.....	66
4.4. Processamento de dados: identificação de variantes de hemoglobina e criação de uma biblioteca FASTA.....	67
4.5. Processamento de dados: quantificação de HbA1c com abordagem de aquisição independente de dados e amostragem por VAMS.....	80
4.5.1. Validação do método de quantificação por DIA.....	81
4.5.2. Teste de estabilidade da HbA1c em amostragem VAMS entre coleta venosa e capilar.....	85
5. Conclusão.....	90
REFERÊNCIAS1.....	91
ANEXOS.....	104
ANEXO A – Aprovação do Comitê de Ética.....	104
ANEXO B – Termo De Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE.....	107
ANEXO C – Resultados do estudo de imprecisão pelo programa EP Evaluator.....	108
ANEXO D – Ficha do aluno.....	111
ANEXO E – Currículo Lattes.....	113
ANEXO F – SUBMISSÃO DO ARTIGO.....	114

1. Introdução

O diabetes mellitus (DM) compreende um grupo de alterações metabólicas caracterizado por hiperglicemia resultante de defeitos na secreção de insulina e, ou sua ação. A insulina é um hormônio produzido pelo pâncreas com papel importante na regulação dos níveis da glicose na corrente sanguínea, regulando a produção e o armazenamento da mesma (ABBOTT; MALIK; VAN ROSS; KULKARNI *et al.*, 2011).

O DM é provavelmente uma das doenças mais antigas conhecidas pelo homem, sendo que o primeiro relato sobre a doença em um manuscrito egípcio data aproximadamente há 3000 anos atrás (AHMED, 2002). Em 1936 houve a primeira diferenciação entre os tipos 1 e 2 da doença. Com o sucesso notável do uso da insulina para tratar o DM, era entendido até então que a doença era causada apenas pela deficiência da produção do hormônio. Mais tarde com uma série de observações feitas pelo médico britânico Harry Himsworth, descobriu-se que o organismo pode apresentar diferentes graus de sensibilidade aos efeitos da insulina e que a alimentação poderia influenciar muito neste efeito (PATLAK, 2002).

Somente em 1965 houve o primeiro Comitê de Especialistas em Diabetes Mellitus da Organização Mundial da Saúde (OMS) em Genebra, relatando o primeiro consenso internacional sobre a classificação do DM. Várias nomenclaturas e critérios diagnósticos foram propostos posteriormente em 1980. Estas informações foram muito importantes para um entendimento melhor da doença como fatores geográficos, sociais, culturais, comportamentais e os fatores de risco que permeiam o DM (ZIMMET; ALBERTI; MAGLIANO; BENNETT, 2016).

1.1. Diferenciação e epidemiologia do diabetes mellitus

O diabetes mellitus tipo 1 (DM1) é caracterizado principalmente pela hiperglicemia secundária à deficiência insulínica, causada pela destruição auto-imune das células β produtoras de insulina nas ilhotas pancreáticas (ATKINSON; EISENBARTH; MICHELS, 2014). Habitualmente, o DM1 é diagnosticado entre a infância e a adolescência, porém pode acometer qualquer idade. Hoje afeta cerca de 20 milhões de pessoas no mundo, sendo responsável por 5 a 10% de todos os casos de DM (CHETAN; THROWER; NARENDRAN, 2019).

O diabetes mellitus tipo 2 (DM2) é uma doença heterogênea e complexa caracterizada por hiperglicemia crônica, resultante da deficiência da síntese de insulina e/ou sua ação. Atualmente é uma das doenças crônicas mais prevalentes no mundo, afetando mais de 400 milhões de indivíduos, e trata-se de uma condição de grande relevância, pois é causa de grande morbi-mortalidade (Peppia M, 2005). Aproximadamente, 75% dos indivíduos que possuem DM2 sofrerão um evento cardiovascular fatal (OGURTSOVA; DA ROCHA FERNANDES; HUANG; LINNENKAMP *et al.*, 2017); (ZIMMET; ALBERTI; MAGLIANO; BENNETT, 2016).

A prevalência global do DM e tolerância à glicose vêm aumentando nas últimas décadas (CHO; SHAW; KARURANGA; HUANG *et al.*, 2018; OGURTSOVA; DA ROCHA FERNANDES; HUANG; LINNENKAMP *et al.*, 2017). E esse ritmo de aumento da prevalência da doença tem sido estimulado pela rápida urbanização das cidades e a adoção de um estilo de vida mais sedentário pelas pessoas (BLAS; KURUP, 2010).

Em 2017, foi estimado 425 milhões de casos de DM entre adultos com faixa etária entre 20 e 79 anos. Para esta mesma faixa etária, espera-se que em 2045 este número aumente para 629 milhões de casos de DM, equivalentes a 9,9% da população global (CHO; SHAW; KARURANGA; HUANG *et al.*, 2018).

Foram encontradas diferenças significantes na prevalência da DM de acordo com o sexo, faixa etária, região geográfica e classe social. A prevalência do diabetes entre idosos de 65 a 69 anos foi três vezes maior em países de alta renda em comparação com países de baixa renda (CHO; SHAW; KARURANGA; HUANG *et al.*, 2018).

Estimou-se que cerca de 5 milhões de mortes em todo o mundo foram atribuídas ao diabetes entre pessoas de 20 a 99 anos em 2017, o que corresponderia cerca de 9,9% da mortalidade global por todas as causas de mortes no mesmo ano entre pessoas nesta faixa etária. Mais de um terço (1,8 milhões) de mortes pelo DM, ocorreram em pessoas com menos de 60 anos, todavia, o número total de mortes causadas pelo diabetes foi mais alto na região do Pacífico Ocidental (com 1,7 milhões) e o menor na América do Sul e Central (com 0,27 milhões) (CHO; SHAW; KARURANGA; HUANG *et al.*, 2018).

Segundo o levantamento feito em 2017 pelo *National Diabetes Statistics Report* nos Estados Unidos da América, estima-se que 30,3 milhões de pessoas de todas as idades tiveram diabetes em 2015 no país o que corresponde a cerca de 9,4% da população Norte Americana. Deste total, cerca de 5% apenas corresponde ao tipo 1 da doença. A incidência neste ano foi de 1,5 milhões de novos casos contabilizando apenas adultos acima de 18 anos (National Diabetes Statistics Report, 2017).

1.2. Hemoglobina glicada A1C

A hiperglicemia ainda é considerada o grande pilar das complicações do DM. O aumento da disponibilidade de glicose resulta na formação dos chamados produtos da glicação que estão relacionados à patogênese de complicações como neuropatia, nefropatia e retinopatia diabética (STRATTON; ADLER; NEIL; MATTHEWS *et al.*, 2000).

Hodge em 1953 (HODGE, 1953), já relatava que a glicação é considerada o primeiro passo de uma complexa série de reações não enzimáticas que ocorrem na presença de açúcares redutores e grupos amino livres de proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos. Os produtos iniciais destas reações são bases de Schiff (instáveis), oriundas da condensação de grupamento carbonila de açúcar redutor a um grupo amina. Quando esta sofre rearranjos estruturais capazes de torná-la mais estável, passa a se chamar de produto de Amadori, como é o caso da hemoglobina glicada A1C (HbA1c) (BIERHAUS; HOFMANN; ZIEGLER; NAWROTH, 1998). A figura abaixo esquematiza este processo (Figura 1).

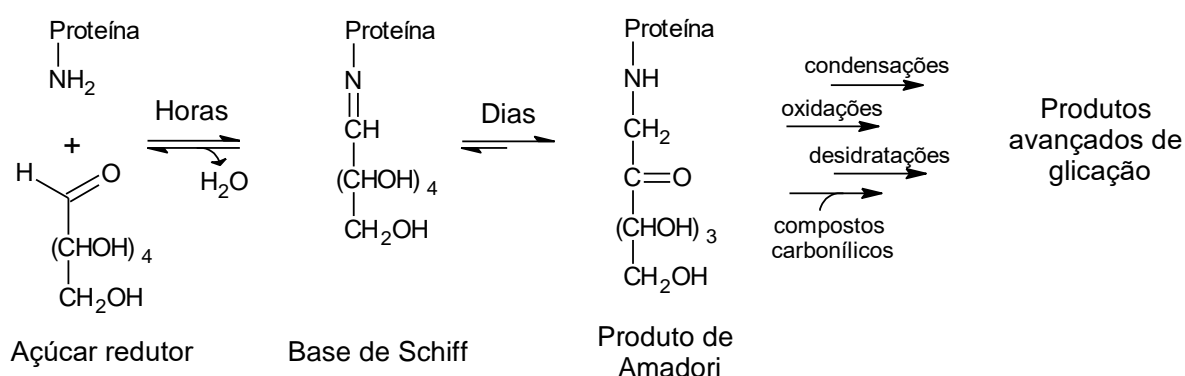


Figura 1. Processos associados às reações de glicação não enzimática.

A hemoglobina (Hb) é constantemente submetida à glicação ao longo de sua vida útil, e este equilíbrio ocorre de acordo com a quantidade de glicose disponível e o processo de hemocaterese. Portanto, a glicação é conhecida como um marcador glicêmico de longo prazo, cerca de 8 à 12 semanas, que é o tempo da meia-vida das hemácias (Standards of Medical Care in Diabetes-2016: Summary of Revisions, 2016).

Nas cadeias globínicas há vários sítios diferentes de ligações com a glicose, com variados graus de susceptibilidade de glicação. A HbA1c refere-se apenas a glicação na porção N-terminal (Val-1) da cadeia beta e é o principal marcador usado com finalidade clínica no mundo (2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes-2020, 2020; SACKS; ARNOLD; BAKRIS; BRUNS *et al.*, 2011). Grandes estudos como o *United Kingdom Prospective Diabetes Study* (UKPDS) e o *Diabetes Control Clinical Trial* (DCCT) desenvolvidos na década de 90, indicaram que para cada 1% de decréscimo nos valores de hemoglobina glicada HbA1c havia melhora significativa do controle glicêmico, o que reduz significativamente o risco do surgimento de complicações crônicas decorrentes do diabetes (NATHAN; GENUTH; LACHIN; CLEARY *et al.*, 1993).

A HbA1c pode ser rotineiramente detectada e quantificada a partir de diferentes métodos analíticos, incluindo imunoensaios, eletroforese capilar, cromatografia por afinidade a boronato e por troca iônica. Estes métodos são vulneráveis a diferentes interferentes, como por exemplo, a existência de hemoglobinas variantes (JAISSON; LEROY; DESROCHES; TONYE-LIBYH *et al.*, 2013; LITTLE; ROHLFING; SACKS, 2011). Cada método possui vantagens e desvantagens a depender dos princípios de detecção empregados podendo resultar em valores falsamente elevados ou baixos. (LITTLE; LA'ULU; HANSON; ROHLFING *et al.*, 2015). Além das variantes de hemoglobina, derivados gerados por modificações químicas, que podem estar cronicamente presentes em pacientes diabéticos, também podem afetar a precisão nas medições de HbA1c. Estas modificações podem se assemelhar fisicamente e quimicamente com a Hb glicada, como a Hb carbamilada (carbamyl-Hb), que está aumentada em pacientes urêmicos e representa o derivado mais frequentemente encontrado. Altas concentrações de Hb acetilada ocorrem com mutações incomuns na porção N-terminal da cadeia beta-globina, aumentando a formação de acetil-Hb *in*

vivo, levando a determinações imprecisas de HbA1c, particularmente quando usado em métodos de separação com base em diferenças de carga (WEYKAMP; PENDERS; SIEBELDER; MUSKIET *et al.*, 1993). Além disso, quaisquer condições que encurtem a sobrevivência dos eritrócitos podem reduzir falsamente os valores da Hb glicada determinados (SACKS; ARNOLD; BAKRIS; BRUNS *et al.*, 2011).

Mais de 1000 hemoglobinas variantes já foram identificadas (OLD, 2007). A maioria delas são clinicamente silenciosas, porém de grande importância na quantificação de HbA1c, uma vez que podem tornar vários métodos inespecíficos podendo, portanto, comprometer o tratamento dos indivíduos com diabetes. A cromatografia líquida de alta eficiência de troca iônica é um dos métodos mais utilizados hoje em dia para esta dosagem e é um dos mais suscetíveis à este tipo de interferência (NIGAM; SHARMA; SAREEN; PAUL *et al.*, 2006).

1.3. Determinação da HbA1c

Existem pelo menos 30 ensaios laboratoriais disponíveis comercialmente para a quantificação da HbA1c no sangue. Esses métodos foram desenvolvidos explorando as diferenças físicas e químicas entre as espécies de hemoglobina glicada e não glicada, como as estruturas e cargas. Protocolos de separação dos componentes menores da Hb foram descritos já nos anos 1950 a partir de colunas cromatográficas longas e métodos demorados (ALLEN; SCHROEDER; BALOG, 1958). Com o passar dos anos, muitos outros protocolos foram desenvolvidos, ganhando além de agilidade e robustez, excelente reprodutibilidade, menor interferência, automatização e facilidade de execução (JOHN, 2003).

1.3.1. Cromatografia de troca iônica (IEX)

A junção da glicose a uma hemoglobina reduz o ponto isoelétrico da molécula causando uma ligeira alteração na carga da hemoglobina glicada. Essa alteração promove uma aceleração de sua migração em campos elétricos ou redução da força de interação com resinas de troca catiônica (ALLEN; SCHROEDER; BALOG, 1958). O primeiro método de cromatografia de troca iônica para a detecção de HbA1c foi descrito na década de 1950, mas sua aplicabilidade no meio clínico se deu apenas

em 1978 graças à introdução de colunas mais curtas resultando em análises mais rápidas e reprodutíveis.

Os sistemas baseados em cromatografia de troca iônica de baixa pressão são mais simples e acessíveis pois utilizam minicolunas capazes de processar cerca de 150 amostras. Como a capacidade de processamento é de seis a doze amostras por hora, são mais utilizados em laboratórios de pequeno porte. Esses métodos reportam resultados em porcentagem de hemoglobina A1 (HbA1) e HbA1c e são suscetíveis a interferência pela hemoglobina fetal, mas não pela hemoglobina S (Hb S) (JOHN, 2003).

Os sistemas cromatográficos de alta pressão são atualmente os mais difundidos nos laboratórios clínicos (COLE; SOELDNER; DUNN; BUNN, 1978; DAVIS, 1978). Normalmente utilizam gradiente terciário e colunas com capacidade para 1000 análises. Possuem excelente precisão, com coeficientes de variação (CV) inferiores a 3%. Alguns destes analisadores são totalmente automatizados e incluem dispositivos para a diluição, hemólise e remoção dos intermediários da base de Schiff. Essa última pode ser obtida através de duas maneiras, a depender do analisador: remoção por meios químicos (incubando com solução salina, por exemplo) ou remoção como uma fração distinta mensurável. Dentre os principais sistemas baseados em cromatografia de IEX de alta pressão destacam-se Variant 1 e Variant 2 (Bio-Rad; Hemel Hempstead, Reino Unido), HA-8140 e HA-8160 (Menarini Diagnostics; Wokingham, Reino Unido) e HLC 723 GHBD (Tosoh Bioscience, Redditch, Reino Unido) (DUNN; COLE; SOELDNER, 1979; JEPPSSON; JERNTORP; SUNDKVIST; ENGLUND *et al.*, 1986; JOHN, 2003).

1.3.2. Cromatografia de afinidade

O método de separação por afinidade, descrito em 1981, é baseado na interação do grupo 1,2-*cis* diol da hemoglobina glicada com o ácido *m*-amino fenil borônico imobilizado em uma fase sólida (MALLIA; HERMANSON; KROHN; FUJIMOTO *et al.*, 1981). Em solução aquosa, o ácido borônico forma um complexo covalente reversível com grupos hidroxila vicinais. Forças iônicas e hidrofóbicas também contribuem para a interação. Como a hemoglobina não glicada não interage com essa fase sólida, é eluída pelo primeiro tampão e a glicada é posteriormente

desligada com a aplicação de uma solução que compete pelos sítios de ácido borônico (MALLIA; HERMANSON; KROHN; FUJIMOTO *et al.*, 1981; MIDDLE; BANNISTER; BELLINGHAM; DEAN, 1983).

A cromatografia por afinidade também alcançou um desempenho semelhante à IEX evoluindo de procedimentos manuais, trabalhosos e de baixo rendimento para plataformas de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Vários sistemas de HPLC por afinidade podem ser encontrados no mercado sendo que os mais difundidos são: CLC 330 e CLC 385 (Primus Corporation, Kansas City, EUA), PDQ e PDQ Plus (Primus Corporation), Variante 1 Total GHb (Bio-Rad) e DS 2200+ (Drew Scientific Ltd, Barrow in Furness, UK). Esses sistemas possuem um alto rendimento analítico sendo capazes de processar amostras em 2 minutos e com imprecisões inferiores a 3%. Essa técnica a rigor poderia ser considerada como indireta para a HbA1c, pois os resultados são obtidos em hemoglobina glicada total (GHb) e posteriormente convertidos em valores de HbA1c. Uma das vantagens da cromatografia por afinidade é a menor interferência por variantes de hemoglobinas frente aos demais métodos de separação. (JOHN, 2003).

1.3.3. Eletroforese

A eletroforese é uma técnica de separação baseada na migração de compostos iônicos ou ionizáveis em um campo elétrico (BIER, 2013). Assim como nas técnicas cromatográficas, a determinação da HbA1c por meio de técnicas eletroforéticas tem evoluído continuamente alcançando níveis elevados de automação. Um exemplo é o sistema V8 Nexus (Helena Laboratories, Gateshead, UK) que incorpora preparo automatizado de amostras e processamento de 32 amostras por hora. Outros modelos automatizados como o Capillarys 2 Flex Piercing (Sebia, Lisses, França) baseados em eletroforese capilar já foram bem correlacionados aos métodos de HPLC e demonstram ótimo desempenho para a determinação da HbA1c (DOGGUI; ABDELHAFIDH SAHLI; AISSA; HAMMAMI *et al.*, 2017). Os sistemas automatizados de eletroforese para determinação de HbA1c podem apresentar imprecisões inferiores a 3%, mas assim como os métodos cromatográficos, estão sujeitos a interferências por Hbs anômalas (JOHN, 2003; KEATING; PATTISON; SHERWOOD, 1991).

1.3.4. Imunoensaio

O primeiro imunoensaio desenvolvido para a determinação da HbA1c foi descrito em 1978, mas levou quase uma década para que os métodos comerciais tivessem afinidade suficiente e nenhuma reatividade cruzada. (JAVID; PETTIS; KOENIG; CERAMI, 1978). O primeiro ensaio introduzido na rotina clínica foi um imunoensaio enzimático da Dako Diagnostics (Novo-Clone, Dako Diagnostics, Ely, UK). Nesse tipo de ensaio, as hemácias da amostra são hemolisadas, a hemoglobina é oxidada e o pH é ajustado para favorecer a ligação a uma microplaca de titulação. A hemoglobina não ligada é então removida por lavagem, o conjugado formado por anticorpo monoclonal-enzima liga-se à HbA1c imobilizada na placa e o excesso de conjugado é removido por lavagem. Finalmente, a HbA1c é detectada por espectrofotometria após a adição de um reagente cromogênico, como o 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) que é oxidado pela enzima peroxidase de rábano conjugada ao anticorpo e produzindo uma diimina que pode ser medida no comprimento de onda de 450 nm (JOHN, 1993) após a adição de uma solução ácida.

O primeiro imunoensaio turbidimétrico de HbA1c, Tina-Quant, foi introduzido pela Boehringer Mannheim (atual Roche Diagnostics Systems, Mannheim, Alemanha) e é baseado na determinação fotométrica da hemoglobina total e na determinação imunoturbidimétrica da HbA1c. Um anticorpo que reconhece os quatro primeiros aminoácidos da cadeia beta da hemoglobina interage com a HbA1c gerando um complexo imunológico solúvel. Os polihaptenos ligam-se então aos anticorpos em excesso e os complexos aglutinados resultantes são medidos turbidimetricamente a 340 nm, onde a concentração é inversamente proporcional à concentração do analito na amostra. A hemoglobina total é medida simultaneamente por fotometria a 570 nm. Devido à utilização de anticorpos de alta especificidade, o método não apresenta reação cruzada com hemoglobina A não glicada (HbA0), hemoglobina A1a (HbA1a), hemoglobina A1b (HbA1b), hemoglobina acetilada, carbamyl-Hb ou base de Schiff (CULLY; BURNS; ENGEL, 1992).

1.4. Efeitos das principais hemoglobinas variantes nos testes comercializados para determinação da HbA1c

Embora a técnica de HPLC de troca catiônica seja considerado o método referência padrão ouro, a presença de hemoglobinas variantes pode interferir diretamente nas determinações da HbA1c, quando não é possível a separação da HbA1c das espécies de HbA e das Hb variantes (BRY, LYNN; CHEN, PHILIP C.; SACKS, DAVID B., 2001; SAW; LOH; YIN; SETHI, 2013). Idealmente, a detecção das variantes da hemoglobina deveria ser feita antes de realizar a quantificação da HbA1c. No entanto, na rotina diagnóstica nem sempre isso é possível pois os métodos para identificação de variantes não são acessíveis e muitas das variantes que interferem com a determinação da HbA1c são silenciosas.

Segundo o levantamento realizado por Bry e colaboradores em 2001, sobre os efeitos das principais hemoglobinas variantes em testes comerciais, os ensaios de cromatografia de troca catiônica dos kits Bio-Rad Variant, Bio-Rad Diamat, Tosohg Hb 2.2 AC+ e Menarini 8140 apresentam suposto aumento da HbA1c na presença das variantes carbamyl-Hb e HbS (WEYKAMP; PENDERS; SIEBELDER; MUSKIET *et al.*, 1993) e valores falsamente baixos e/ou com necessidade de ajuste de cálculo nos casos de hemoglobina E (Hb E) (ROBERTS; FRANK; MOULTON; PAPADEA *et al.*, 2000). Os ensaios dos kits Bio-Rad Diamat, Tosohg Hb 2.2 AC+ e Menarini 8140 não são adequados para quantificar HbA1c nos casos de HbS homozigota ou HbC (CARTA; DALL'OLIO; SOFFIATI, 1997; KHUU; ROBINSON; GOOLSBY; HARDY *et al.*, 1999; WEYKAMP; PENDERS; SIEBELDER; MUSKIET *et al.*, 1993) e Bio-Rad Diamat na presença de HbSC apresenta resultado falsamente baixo (WEYKAMP; PENDERS; SIEBELDER; MUSKIET *et al.*, 1993). Dos kits comerciais por imunoensaio, o teste Roche Unimate superestima os valores nos casos de HbS e HbC (ROBERTS; CHIASERA; WARD-COOK, 1999) e o teste Pierce Glycotest II, por cromatografia de afinidade a boronato, requer adequação do valor de referência da HbA1c nos casos de HbS homozigoto e HbC homozigoto (WEYKAMP; PENDERS; SIEBELDER; MUSKIET *et al.*, 1993).

Em algumas condições clínicas, a determinação de HbA1c não é indicada devido aos tempos de vida alterados das hemácias. Exemplos frequentes na rotina

clínica são os homozigotos para HbS ou HbC ou heterozigotos compostos para HbSC (BRY, LYNN; CHEN, PHILIP C.; SACKS, DAVID B., 2001). Nesses casos, restam poucas alternativas de marcadores glicêmicos. A frutossamina por exemplo, é indicada para o controle do diabetes em anemias hemolíticas e hemoglobinopatias que reduzem a meia-vida reduzida dos glóbulos vermelhos, como a anemia falciforme (SAW; LOH; YIN; SETHI, 2013).

1.5. Programas de padronização da dosagem de HbA1c

Em função da diversidade metodológica e das limitações descritas, surgiu a necessidade de se desenvolver programas de padronização para a determinação da Hb glicada, com base nas diretrizes da DCCT e UKPDS. Em 1995, a instituição *International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* (IFCC) estabeleceu um grupo de trabalho com objetivo de padronizar a medição da HbA1c por espectrometria de massas (MS), que já era considerada padrão ouro para a quantificação de diversos analitos. Outra iniciativa, lançada em 1996, foi o *National Glycohemoglobin Standardization Program* (NGSP) que teve como finalidade a comparação e certificação de vários métodos utilizados para dosagem da HbA1c. A unidade de medida adotada para a determinação da HbA1c difere entre os programas. O mais disseminado para esta prática é o modelo do NGSP em porcentagem (% HbA1c) enquanto a IFCC adota a medida em mmol de HbA1c por mol de Hb (mmol HbA1c/mol HB). Para a conversão entre as diferentes unidades de medida foi determinada e estabelecida a equação: $NGSP = 0,09148 * IFCC + 2,152$ (DHATT; AGARWAL; BISHAWI, 2005; HOELZEL; WEYKAMP; JEPSSON; MIEDEMA *et al.*, 2004; MOSCA; GOODALL; HOSHINO; JEPSSON *et al.*, 2007).

A espectrometria de massas tem o potencial de determinar a HbA1c mesmo na presença de modificações genéticas ou químicas nas moléculas da hemoglobina (BRY, L.; CHEN, P. C.; SACKS, D. B., 2001). Além disso, essa metodologia pode ser usada para caracterizar as hemoglobinas variantes, incluindo aquelas que interferem na análise da HbA1c (NAKANISHI; MIYAZAKI; IGUCHI; SHIMIZU, 2000). O método de referência padronizado pela IFCC visa essencialmente lastrear outros métodos, entretanto, variantes localizadas nos seis primeiros resíduos da cadeia beta da hemoglobina também afetariam o método de referência da IFCC, que é direcionado

especificamente para a detecção de um peptídeo específico (VHLTPE) e seu correspondente glicado.

1.6. Variantes de hemoglobina e hemoglobinopatias

A hemoglobina (Hb) é uma proteína tetramérica constituída pela combinação de produtos de vários genes combinados em 2 subunidades de um tipo com 2 subunidades de outro tipo de cadeia globínica e normalmente confinada aos eritrócitos circulantes. Cada monômero constituinte da Hb contém uma molécula de heme em sua bolsa hidrofóbica que conferem a função primordial da molécula que é o fornecimento de oxigênio aos tecidos (FARID; BOWMAN; LECAT, 2019; ZHANG, 2011).

Em adultos normais, a Hb humana é composta por 95–98% de hemoglobina A (HbA) resultante da combinação das cadeias polipeptídicas codificadas pelos genes HBA1 e HBA2 cujos produtos são idênticos (cadeias α) e pelo gene HBB que codifica a cadeia β . Os genes HBA1 e HBA2 são adjacentes no cromossomo 16 e codificam uma cadeia de 141 aminoácidos. O gene HBB está localizado no cromossomo 11 e codifica uma cadeia de 146 aminoácidos (GREENE; VAUGHN; CREWS; AGARWAL, 2015). Durante o desenvolvimento embrionário e fetal outros genes são mais ativos e codificam outras cadeias como a δ (gene HBD), HBG1 e HBG2 (correspondentes respectivamente às cadeias γ 1 e γ 2) e outros como HBAZ, HBE, HBAT e HBM. Entre 1,5 e 3,5% da hemoglobina circulante em adultos é do tipo HbA2 (α 2 δ 2) e menos de 1,0% de Hb fetal (HbF) (α 2 γ 2).

Há um amplo e complexo espectro que se estende das variantes de Hb silenciosas às variantes patogênicas, ou hemoglobinopatias, que também se estendem em diversos graus de gravidade. Os tipos mais comuns de variantes de Hb são do tipo de substituição única de aminoácido e de padrão de transmissão autossômico recessivo. Alterações presentes em heterozigose, na maioria das vezes, resulta em quadros assintomáticos (GULANI; WEILER, 2020; RAI; MALIK, 2016).

As variantes da Hb (HbVar) são classificadas em dois grandes grupos: as variantes estruturais que correspondem aos casos onde se encontram alterações nas sequências de aminoácidos originando uma hemoglobina anômala (HUISMAN;

CARVER; EFREMOV, 1996); e as talassemias que reduzem ou inibem a produção de cadeias globínicas (TITUS; HUISMAN; CARVER; BAYSAL, 1997). Mais de 1000 variantes de Hb e 500 tipos de talassemias estão registradas no banco de dados HbVar (disponível do Globin Gene Server; <https://globin.bx.psu.edu/>) sendo atualizado regularmente (GIARDINE; BORG; VIENNAS; PAVLIDIS et al., 2014; GIARDINE; VAN BAAL; KAIMAKIS; RIEMER et al., 2007).

Os primeiros relatos dos tipos de hemoglobinas foram descritos em 1949 por Linus Pauling que desvendou a estrutura da HbA e as bases moleculares das doenças Hb e HbC (PAULING; ITANO; SINGER; WELLS, 1949). No ano seguinte, Itano e colaboradores identificaram a HbD, como uma hemoglobina com mobilidade eletroforética similar à da HbS em meio alcalino e similar a HbA em meio ácido, além de exibir solubilidade normal em seu estado reduzido, sem apresentar falcização (ITANO, 1951). Estas descobertas abriram portas para o estudo de outras variantes associadas a diferentes etnias e que foram nomeadas de acordo com a região em que foram descritas. Em 1962 um estudo conduzido por Baglioni analisou a estrutura molecular de cinco hemoglobinas (Hb D-Chicago, Hb D-Carolina do Norte, Hb D-Punjab, Hb D-Portugal e Hb D-Oak Ridge) e descobriu que todas exibiam a mesma composição da Hb D-Los Angeles (BAGLIONI, 1962; VELLA; LEHMANN, 1974). Esta é a variante de hemoglobina mais frequente e bastante comum em países como a Itália, Bélgica, Áustria e em algumas cidades da Turquia e China (ATALAY; KOYUNCU; TURGUT; ATALAY et al., 2005; LI; ZHAO; QIN; LI et al., 1990; PANDEY; MISHRA; PANDEY; SHAH et al., 2012).

Em locais do planeta onde a malária é ou já tenha sido endêmica, cerca de 3 a 40% dos indivíduos são portadores das variações HbS, HbC e da talassemia α - indicando seleção natural dos indivíduos heterozigotos (ANGASTINIOTIS; MODELL, 1998; MODELL; DARLISON, 2008). Outras variantes comuns são Hb Kansas, HbE, HbH, Hb O-Arab, Hb G-Filadélfia, Hb Hasharon, Hb Lepore, HbM, HbF, Hb Hope, Hb Pisa, HbJ e Hb N-Baltimore entre outras (DASAUNI; CHHABRA; KUMAR; KUNDU, 2021).

1.6.1. Epidemiologia das hemoglobinopatias no Brasil

Estudos epidemiológicos das hemoglobinopatias associando fatores endêmicos e étnicos tem apontado uma expansão da distribuição pelo mundo em função da migração e miscigenação dos povos (LIVINGSTONE, 1985; WEATHERALL; CLEGG, 2001). No Brasil, a distribuição das variantes de Hb e das hemoglobinopatias refletem o padrão do povoamento e colonização do país resultando em grande variabilidade genética. Nesse conjunto destacam-se as anemias hereditárias como as mais prevalentes (LEONELI; UNESP; MELO; HEMOCENTRO FOUNDATION et al., 2001; PC, 1997).

As hemoglobinopatias mais prevalentes são as hemoglobinas S e C, que na forma heterozigótica são encontradas, respectivamente, em 6% e 1% da população. Sendo mais prevalente em pessoas de pele negra. Outra condição muito prevalente é a beta talassemia, cuja frequência é de 1% em caucasianos (NAOUM, 1999; PC, 1997; RAMALHO, 1986). Um estudo recente de prevalência das hemoglobinopatias no Brasil, publicado por Rosenfeld e colaboradores abrangendo 8.715 voluntários adultos, revelou que há a presença de hemoglobinopatias em 3,7% da população testada. As hemoglobinopatias mais observadas foram traço falciforme (2,49%), talassemia menor (0,3%), suspeita de talassemia maior (0,8%) e portador de hemoglobina C (0,004%) (ROSENFELD; BACAL; CUDER; SILVA et al., 2019).

1.6.2. Diagnóstico das hemoglobinopatias

Um conjunto extenso de metodologias são atualmente necessárias para o diagnóstico das hemoglobinopatias, como testes clínicos clássicos como o hemograma que pode fornecer indícios de desvio das proporções normais das hemoglobinas e testes mais específicos para esse fim como as técnicas de separação que permitem discriminar cadeias de Hb anômalas das normais (GREENE; VAUGHN; CREWS; AGARWAL, 2015; RHEA; MOLINARO, 2014). Portanto, o diagnóstico clínico laboratorial pode ser bastante complexo e requer a combinação de diversos parâmetros laboratoriais aliados à análise de dados clínicos pela equipe médica. A combinação de todos estes elementos muitas vezes é o que pode garantir o diagnóstico correto e fornecer elementos para a seleção do tratamento (GREENE; VAUGHN; CREWS; AGARWAL, 2015).

Um princípio amplamente usado na detecção de variantes de Hb são as alterações das cargas líquidas das cadeias polipeptídicas. Muitas vezes, uma substituição de aminoácidos resulta em alterações nos pontos isoelétricos das proteínas permitindo a discriminação por meio de técnicas eletroforéticas e cromatografia de troca iônica (SANDOVAL-LIRA; MONDRAGÓN-SOLÓRZANO; LUGO-FUENTES; BARROSO-FLORES, 2020). Em outros casos, a substituição não resulta em alteração na carga líquida da proteína mas em uma diferença de hidrofobicidade permitindo a aplicação da cromatografia de fase reversa (GIARDINE; BORG; VIENNAS; PAVLIDIS *et al.*, 2014; LEONE; MONTELEONE; GABUTTI; AMIONE, 1985).

No entanto, em muitos casos a identificação da alteração molecular da hemoglobina só pode ser alcançada com a aplicação de testes genéticos que possibilitam avaliar diretamente as alterações nas sequências dos genes que codificam as cadeias polipeptídicas da Hb. No entanto, a aplicação universal dos testes genéticos enfrenta diversos desafios técnicos. Neste cenário, a espectrometria de massas vem despontando como uma alternativa na análise direta das alterações moleculares que caracterizam as variantes de Hb (AEBERSOLD; MANN, 2003; WADA; HAYASHI; FUJITA; MATSUO *et al.*, 1981; ZANELLA-CLEON; JOLY; BECCHI; FRANCIANA, 2009).

1.6.2.1. Hemograma completo

As informações hematológicas obtidas em um hemograma completo são importantes aliadas da análise de hemoglobina no diagnóstico das hemoglobinopatias, principalmente para as talassemias. Para as talassemias a principal característica hematológica encontrada é a anemia hipocrômica, onde o volume corpuscular médio inferior a 80 fL é usualmente aplicado como ponto de corte para a suspeita de talassemia (LEUNG; LAU; CHUNG, 2005; SIN; GHOSH; TANG; CHAN, 2000). A anemia microcítica hipocrômica pode ser observada também na anemia ferropriva, entretanto, enquanto as talassemias tendem a apresentar um aumento da contagem de hemácias enquanto que a amplitude de distribuição de eritrócitos (RDW) encontra-se normal, na ferropriva, observa-se uma contagem diminuída das hemácias e aumento do RDW (GIORDANO, 2013).

Outros fenótipos adicionais observados nas variantes de hemoglobinas são: diminuição da concentração de hemoglobina, diminuição do volume corpuscular médio, anisopoiquilocitose (formato e tamanho alterados das hemácias) e presença de células-alvo (GIORDANO, 2013).

1.6.2.2. Cromatografia de troca iônica e eletroforese capilar

A cromatografia de troca iônica (IEX) e a eletroforese capilar (CE) associadas à detecção espectrofotométrica são amplamente usadas para a determinação de variantes de hemoglobina. Os princípios de separação são essencialmente os mesmos nas duas técnicas, ou seja, a discriminação das variantes pelas diferenças das cargas líquidas. Na CE, diferentes migrações eletroforéticas podem ser obtidas modulando-se por exemplo o pH do tampão e o fluxo eletrosmótico (GREENE; VAUGHN; CREWS; AGARWAL, 2015). De um modo simples, em casos de anormalidade de Hb é observado no cromatograma (ou no eletroferograma) um pico incomum às demais espécies de Hb (HbA, HbA2, HbF).

A IEX acumula anos de uso na rotina clínica e há um extenso conhecimento descrito sobre os padrões cromatográficos de variantes raras facilitando a interpretação dos resultados. O uso da CE cresceu nos últimos anos por apresentar algumas vantagens sobre a IEX como padrões de separação mais limpos (BORBELY; PHELAN; SZYDLO; BAIN, 2013). No entanto, a variabilidade dos capilares de CE impõe alguns desafios como a necessidade de atribuição dos padrões de migração pela HbA e HbA2 normalmente presentes em cada amostra. Nos casos de paciente com ausência de HbA (hemoglobinopatias homocigotas ou heterocigotas compostas) é necessário uma diluição de 1:1 com sangue total normal para confirmar a identidade das variantes em relação à migração da Hb A (KEREN; HEDSTROM; GULBRANSON; OU *et al.*, 2008).

Há muitos relatos de situações em que a IEX e a CE são incapazes de resolver interferências por algumas variantes, mesmo dentre as mais conhecidas. A IEX não resolve a HbE de hemoglobina A2 (HbA2), impossibilitando a quantificação adequada de nenhuma das espécies de Hb. Esta limitação pode ser crucial na diferenciação do fenótipo de portador de HbE e HbE associado a uma talassemia beta. Nestes casos, o cromatograma mostrará um nível bastante elevado de HbE e HbF e um pico de Hb

A pequeno ou ausente (HIGGINS; MACK; KHAJURIA, 2009). HbA2 falsamente elevada por IEX pode ocorrer em pacientes com HbS devido à co-eluição da HbS glicada (HbS1c) (GREENE; VAUGHN; CREWS; AGARWAL, 2015).

Em CE, a HbA2 pode apresentar-se falsamente elevada em presença de HbC em virtude do tempo de migração semelhante (GREENE; PYLE; CHANG; HOKE *et al.*, 2012). Em pacientes com HbS, a HbF apresenta valores falsamente elevados possivelmente devido à co-migração da HbS degradada com a HbF ou à co-migração da HbF com alguma modificação pós-traducional ainda não caracterizada (GREENE; VAUGHN; CREWS; AGARWAL, 2015). A CE resolve as formas HbH e Hb Bart's permitindo quantificações em concentrações superiores a 3%. A IEX normalmente apresenta limitações na análise dessas formas pois são eluídas próximas ao volume morto da coluna (GREENE; VAUGHN; CREWS; AGARWAL, 2015; KAR; SHARMA, 2011).

Sendo as hemoglobinopatias as doenças hereditárias mais comuns nos seres humanos (DAVIES; CRONIN; GILL; GREENGROSS *et al.*, 2000) afetando cerca de 7% da população mundial (PATRINOS; GIARDINE; RIEMER; MILLER *et al.*, 2004), a IEX e a CE tem usos muito importantes na triagem neonatal. Nesse caso, a única diferença está no tipo de origem da amostra, pois normalmente são utilizadas amostras de sangue de cordão umbilical ou sangue por punção capilar aplicado e seco em papel filtro (*Dried Blood Spot*, DBS). Ambas as técnicas possuem 100% de sensibilidade para detecção das variantes de Hb mais comuns como HbS, C, D, E ou talassemia beta, além da identificação das HbF e HbA. As talassemias podem ser detectadas avaliando a concentração relativa de HbA, diminuída na talassemia beta, ou pela detecção da Hb Bart, indicando talassemia alfa (DE CASTRO LOBO; BALLAS; DOMINGOS; MOURA *et al.*, 2014; MANTIKOU; ARKESTEIJN; KERKHOFFS; HARTEVELD *et al.*, 2009; VAN ZWIETEN; VELDTHUIS; DELZENNE; BERGHUIS *et al.*, 2014).

Como o padrão de migração das hemoglobinas variantes na IEX ou CE não é inequívoco, o *College of American Pathology* (CAP) recomenda que todos os laboratórios que realizam análise de Hb apoiem quaisquer interpretações anormais usando uma técnica de triagem em conjunto com uma técnica secundária para

confirmação. Muitos laboratórios optam pela eletroforese em gel, de placa ou tela biofísica por suas relativas facilidades de implementação. Esta confirmação secundária é muito importante para o diagnóstico das talassemias, juntamente com os resultados do hemograma completo e estudos de ferro (GREENE; VAUGHN; CREWS; AGARWAL, 2015).

1.6.2.3. Eletroforese em gel

Eletroforese em gel, ácidas ou alcalinas, são métodos complementares de separação das espécies de Hb usando uma matriz de polímero tamponada em pH ácido ou básico, respectivamente. A eletroforese de focalização isoelétrica (IEF) apresenta padrão similar de separação da eletroforese alcalina, entretanto, possui maior resolução para as variantes, por isso, é frequentemente considerado o padrão-ouro bioquímico para esta finalidade. Existe uma grande quantidade de literatura disponível que define os padrões de migração esperados usando estas técnicas de eletroforese em gel (GREENE; VAUGHN; CREWS; AGARWAL, 2015).

O padrão de migração da Hb é visualizado normalmente através de uma coloração não específica da proteína. A maior desvantagem desta técnica é a incapacidade de quantificar as espécies de Hb, inviabilizando o diagnóstico de talassemia beta ou a avaliação precisa das razões entre a HbA e HbS (GREENE; VAUGHN; CREWS; AGARWAL, 2015).

1.6.2.4. Diagnóstico molecular

A caracterização de deleções ou mutações pode ser necessária para confirmar o fenótipo clínico e orientar o aconselhamento genético. Há uma grande variedade de técnicas moleculares disponíveis para a identificação de diferentes mutações e deleções nas hemoglobinopatias. Métodos baseados na reação em cadeia da polimerase (PCR), normalmente direcionadas a mutações específicas já caracterizadas, são os mais comuns. Em geral, são metodologias robustas e apresentam boa relação custo-benefício, no entanto limitadas, uma vez que mutações fora das coordenadas genéticas utilizadas no ensaio não são detectadas. Outras técnicas comumente usadas na identificação genética das hemoglobinopatias incluem: Gap-PCR, amplificação de sonda dependente de ligação multiplex (MLPA),

dot blots com hibridização de oligonucleotídeo específica de alelo (ASO) e PCR específica de alelo (GREENE; VAUGHN; CREWS; AGARWAL, 2015).

No diagnóstico das talassemias beta, cuja maioria são oriundas de grandes deleções cromossômicas, é muito difundido o uso do Gap-PCR. Essa técnica permite detectar deleções em pontos de interrupção previamente descritos. Os primers de PCR são projetados para se anelarem nos limites das deleções caracterizadas. Em alelos normais, esses primers estão localizados a vários quilobases de distância, o tempo de alongamento de PCR é limitado para restringir o tamanho do amplificado e conseqüentemente, os produtos de PCR para as deleções direcionadas estarão ausentes. Em contraste, em um alelo que abriga uma deleção específica, os primers *forward* e *reverse* que cercam essa deleção estarão próximos um do outro e, portanto, amplificarão um pedaço do DNA que abrange o ponto de interrupção. Os resultados são visualizados e interpretados separando os produtos de PCR usando eletroforese em gel ou capilar (GREENE; VAUGHN; CREWS; AGARWAL, 2015; TAN; QUAH; LOW; CHONG, 2001).

A MLPA é uma técnica relativamente nova empregada para a detecção multiplexada de deleções e/ou duplicações específicas de genes (GALLIENNE; IBERSON; DRÉAU; JACKSON *et al.*, 2010; LIU; HAN; SCHOUTEN; WANG *et al.*, 2008). Um conjunto de sondas composta por dois oligonucleotídeos adjacentes é projetado para cada região de interesse. Estes conjuntos são hibridizados com o DNA do paciente e então ligados para posteriormente serem amplificados usando seqüências de primers universais presentes nas extremidades das sondas. Apenas as sondas que hibridizarem com o DNA alvo, permitindo a ligação, serão amplificadas. Os produtos amplificados são então separados por eletroforese capilar e a altura dos picos de cada sonda amplificada é comparada à altura do pico correspondente de uma amostra de referência. Uma vantagem do MLPA é a possibilidade de detecção de deleções ou duplicações em várias regiões em um único tubo. Em comparação com o Gap-PCR, que requer conhecimento prévio dos pontos de interrupção exatos, o MLPA pode ser usado para identificar novas mutações (COLOSIMO; GATTA; GUIDA; LEODORI *et al.*, 2011; GALLIENNE; IBERSON; DRÉAU; JACKSON *et al.*, 2010). Ao mesmo tempo, os pontos de interrupção exatos não são identificados pois o mesmo padrão de proporções de sonda pode se aplicar a múltiplas variantes de Hb.

Nestes casos, exige-se a interpretação em conjunto com análise complementar bioquímica (GREENE; VAUGHN; CREWS; AGARWAL, 2015).

As técnicas de *dot blot* com hibridização com oligonucleotídeos específico de alelo (ASO) são técnicas de custo menor comparadas aos demais testes moleculares muito úteis para a detecção de mutações pontuais caracterizadas. Essas técnicas vem sendo usadas em muitos laboratórios em todo o mundo para o diagnóstico, inclusive para triagem pré-natal (LI; LIAO; LI; HUANG *et al.*, 2006). Neste método, o DNA do paciente amplificado que inclui a região de interesse é colocado em membranas de náilon. Cada amostra do paciente é pontilhada como um ponto separado em duas membranas, uma para cada sonda. Duas sondas ASO são usadas para cada mutação, uma complementar à sequência de DNA mutante e a outra à sequência do tipo selvagem. Esses oligonucleotídeos específicos marcados, são hibridizados com o DNA amplificado ligado, sinalizando que o alelo específico selvagem ou mutante está presente. No caso dos pacientes heterozigotos, são emitidos sinais para pontos correspondentes às sondas do tipo selvagem e mutante. No *dot blot* reverso, são as sondas específicas do alelo, neste caso não marcadas, que são fixadas a uma membrana de náilon na forma de pontos. O DNA genômico do paciente é amplificado, rotulado e hibridizado para o filtro. Neste contexto, é possível a testagem de múltiplas mutações do mesmo paciente em uma reação de hibridização, ao invés de múltiplos pacientes (BAGHERNAJAD-SALEHI; D'APICE; BABAMETO-LAKU; BIANCOLELLA *et al.*, 2009; GREENE; VAUGHN; CREWS; AGARWAL, 2015; LIN; ZHU; WANG; XIE *et al.*, 2012).

Uma outra técnica bastante econômica utilizada para detectar mutações comuns em populações específicas é a PCR específica de alelo (AS-PCR), conhecida também como sistema de mutação refratária à amplificação (ARMS), destinada para detecção de mutações pontuais predefinidas em genes de beta globina. Duas reações de PCR diferentes são realizadas para cada posição variante usando primers diretos específicos para o alelo selvagem ou mutante e um primer reverso comum. As reações também podem ser multiplexadas, adicionando em um tubo, primers mutantes específicos para todos os alvos e em outro tubo primers selvagem. Os produtos de PCR são analisados por eletroforese, e as bandas detectadas correspondem ao genótipo do paciente (LITTLE, 1995).

As várias técnicas de sequenciamento de DNA são o recurso mais poderoso na identificação de variantes e hemoglobinopatias. Embora o sequenciamento de Sanger seja utilizado em alguns genes como o HBB, a estrutura complexa de outros genes associados às hemoglobinopatias dificulta a aplicação dessa técnica (ACHOUR; KOOPMANN; BAAS; HARTEVELD, 2021).

O sequenciamento de nova geração (NGS) tem sido crescentemente adotado como solução universal para o diagnóstico de doenças genéticas. No entanto, apesar de avanços metodológicos notáveis que reduziram o custo e a complexidade de processamento desse tipo de sequenciamento, ainda é uma técnica de acesso restrito à maioria da população. Estudos recentes demonstraram o poder do NGS na análise simultânea de diversos genes associados às hemoglobinopatias incluindo os oito genes correspondentes às globinas (HBZ, HBA1, HBA2, HBE1, HBG1, HBG2, HBD e HBB) e também modificações genéticas conhecidas como o KLF1, BCL11A e MYB (SHANG; PENG; YE; ASAN *et al.*, 2017).

1.6.2.5. Uso da espectrometria de massas na identificação de variantes de hemoglobina

O uso da espectrometria de massa (MS) para a análise de variantes de Hb iniciou-se na década de 80, com a publicação do trabalho pioneiro de Wada e colaboradores (WADA; HAYASHI; FUJITA; MATSUO *et al.*, 1981) sobre a análise de peptídeos trípticos de Hb por MS. Desde a última década os enormes avanços na tecnologia, desde a instrumentação de MS e técnicas de ionização, impulsionaram o uso de MS para a identificação de variantes de Hb bem como sua aplicação clínica (HE; ROCKWOOD; AGARWAL; ANDERSON *et al.*, 2019; HELMICH; VAN DONGEN; KUIJPER; SCHARNHORST *et al.*, 2016).

A MS é uma ferramenta analítica de amplo escopo que pode identificar e caracterizar macromoléculas como proteínas, polissacarídeos, lipídeos, DNA, extratos de plantas e pequenas moléculas, como peptídeos e metabólitos de drogas (LIU; WANG, 2015; WANG; WANG; HAN, 2017; ZHANG; VERTES, 2018). Na MS, os íons gerados a partir de compostos orgânicos e inorgânicos são separados de acordo com a sua relação massa/carga (m/z), apresentando grande potencial em detectar diferenças nas sequências das cadeias polipeptídicas entre uma Hb selvagem e uma

mutada. A MS identifica com precisão variantes de Hb e vem sendo incorporada a programas de triagem neonatal graças a sua velocidade, sensibilidade, seletividade e versatilidade (DANIEL; ELION; ALLAF; BADENS *et al.*, 2019).

A análise de proteínas por espectrometria de massas pode ser classificada em dois grupos: proteômicas *bottom up* que se baseia na conversão prévia da proteína em peptídeos por digestão enzimática; e a proteômica *top down*, que visa a análise direta das cadeias polipeptídicas (RAI; ALVELIUS; LANDIN; GRIFFITHS, 2000; RAI; LANDIN; ALVELIUS; GRIFFITHS, 2002; WILD; GREEN; COOPER; LALLOZ *et al.*, 2001). Embora a proteômica *top down* tenha se desenvolvido de forma notável nos últimos anos graças aos avanços tecnológicos nos equipamentos e programas de análise, a abordagem *bottom up* é a abordagem principal na análise de proteínas por espectrometria de massas (AEBERSOLD; MANN, 2003; KELLEHER; LIN; VALASKOVIC; AASERUD *et al.*, 1999; SIUTI; KELLEHER, 2007; THÉBERGE; DIKLER; HECKENDORF; CHUI *et al.*, 2015).

A abordagem de MS de aplicação mais simples é a determinação da massa molecular das hemoglobinas ionizando diretamente a proteína de amostras biológicas e analisando em um único estágio de análise de massas. Essa abordagem permite comparar massas teóricas das cadeias selvagens e eventuais diferenças que poderiam estar associadas a substituições de aminoácidos. No entanto, uma vez que muitas variantes comuns das cadeias globínicas diferem da sequência selvagem por apenas 1 Da, mesmo os espectrômetros de massas de alta resolução podem apresentar limitações. As abordagens de MS que detectam cadeias intactas de globina em geral têm dificuldades de diferenciar cadeias de globina com diferenças sutis de massas dificultando a identificação de vários tipos de substituição de aminoácidos (WILD; GREEN; STEPHENS, 2004). Um exemplo é a substituição da valina por ácido glutâmico na sexta posição, na HbS, que resultará em uma diferença de massa de 30 Da. Algumas substituições são de difícil resolução pela análise da cadeia polipeptídica intacta como entre lisina e glutamina cuja diferença nominal de massa é mínima, ou ainda entre a leucina e a isoleucina que são isômeros. Nesses casos, a abordagem *bottom up* se torna a alternativa mais adequada para a elucidação estrutural pois permite determinar identificar e mapear modificações na estrutura proteica por meio da fragmentação de moléculas relativamente mais simples, os

peptídeos provenientes da proteólise. Os métodos de fragmentação comumente utilizados na análise de variantes de Hb são a dissociação induzida por colisão (CID), a dissociação por captura de elétrons (ECD) e a dissociação de transferência de elétrons (ETD) (DASAUNI; CHHABRA; KUMAR; KUNDU, 2021).

1.7. Aquisição independente de dados (DIA)

A aquisição dependente de dados (DDA) tem sido a técnica predominante e tratada como sinônimo da abordagem proteômica peptídeocêntrica, ou *bottom up*. A DDA não é direcionada e busca analisar a maior porção possível do proteoma inteiro por meio do sequenciamento automatizado de peptídeos. Nessa modalidade, os íons precursores mais abundantes são detectados por uma análise *full scan* (MS1) gerando uma lista de inclusão para que os íons selecionados sejam fragmentados sequencialmente gerando espectros de dissociação (MS2) correspondentes. Posteriormente, a identificação dos peptídeos se dá comumente por uma associação entre os espectros adquiridos e espectros teóricos produzidos a partir de bancos de dados de sequências proteicas (LIU; SADYGOV; YATES, 2004; ZHANG; FONSLow; SHAN; BAEK et al., 2013). Diversas técnicas de quantificação foram desenvolvidas para as aquisições por DDA podendo ser baseadas nas intensidades dos íons precursores ou dos íons produtos. As técnicas quantitativas baseadas em DDA podem ser ainda livres de marcação ou baseadas em marcação química ou metabólica como a marcação de isótopos estáveis em cultura de células (SILAC) e marcação de isóbaros para quantificação relativa e absoluta (iTRAQ) (DAS; MITRA; MATHEW; ROSS et al., 2013; VENABLE; DONG; WOHLSCHLEGEL; DILLIN et al., 2004).

Outras modalidades de aquisição proteômica que têm sido crescentemente aplicadas são as análises direcionadas na quais os espectrômetros de massas são ajustados para a determinação de relações *m/z* específicas. Íons precursores pré-definidos são isolados pelo primeiro estágio de análise por massas e em seguida são submetidos a fragmentação seguidos de um segundo estágio de análise. Nessa modalidade encontramos o monitoramento de reações paralelas (PRM) e monitoramento de reações múltiplas (MRM) que são empregados na determinação de peptídeos pré-determinados num conjunto de proteínas de interesse (GILLET; NAVARRO; TATE; RÖST et al., 2012; KUSEBAUCH; CAMPBELL; DEUTSCH; CHU et al., 2016). Essa modalidade é a que apresenta maior precisão e sensibilidade na

quantificação de proteínas alvo e normalmente está associada à diluição isotópica (LANGE; PICOTTI; DOMON; AEBERSOLD, 2008). A elaboração de uma curva de calibração com concentrações seriadas e conhecidas do peptídeo, permite a quantificação absoluta de proteínas-alvo, além da comparação entre duas amostras, por quantificação relativa (CHAM; BIANCO; BESSANT, 2010). No entanto, as medições de peptídeos direcionados não permitem a identificação de mutações incomuns de Hb ou novas variantes, se eles não estiverem presentes na lista de peptídeos direcionados (DASAUNI; CHHABRA; KUMAR; KUNDU, 2021).

As análises independentes de dados (DIA), combinam características do DDA com a dos métodos direcionados. No entanto, ao contrário do DDA ou dos métodos direcionados, o DIA não realiza seleções de íons específicos para MS2, mas utiliza intervalo de massas (janelas) para a seleção de um grupo de íons que são simultaneamente fragmentados. Os intervalos de massas são deslocados de forma a abranger todo o intervalo de massas que compreende os peptídeos ou o mais próximo disso. Um dos primeiros métodos baseados em DIA foi o SWATH-MS. Os dados DIA contêm uma mistura de peptídeos, bastante complexa, com uma faixa ampla de m/z e difíceis de analisar. No entanto, desenvolvimentos recentes em programas de bioinformática superaram esse problema e várias alternativas livres ou comerciais estão disponíveis como o SWATH, Spectronaut e o Skyline (HU; NOBLE; WOLF-YADLIN, 2016). Foi demonstrado que esse método de aquisição pode aumentar a relação sinal ruído em 3 a 5 vezes e identificar peptídeos não detectados usualmente em um experimento típico de DDA (CARVALHO; HAN; XU; COCIORVA et al., 2010; VENABLE; DONG; WOHLSCHEGEL; DILLIN et al., 2004). Essa modalidade permite a digitalização do conjunto de íons formados a partir do proteoma apresentando o potencial não apenas quantitativo, mas também de identificação de variantes de sequência e modificação pós-traducional. Portanto, quando comparado ao DDA, o DIA em teoria é uma abordagem mais adequada para estudar as variantes de Hb, uma vez que as mutações podem ocorrer em qualquer lugar na sequência das cadeias globínicas (DAS; MITRA; MATHEW; ROSS et al., 2013).

1.8. Técnicas alternativas de amostragem de sangue

A maioria dos testes diagnósticos é baseada em sangue ou derivados como o soro ou plasma que são obtidos por punção venosa. Apesar de amplamente difundidos e altamente padronizados, sistemas alternativos de amostragem de sangue poderiam ser muito úteis em diversas situações como nas quais há indisponibilidade de pessoal habilitado para a punção venosa, na coleta infantil ou ainda na autocoleta domiciliar.

Um sistema alternativo de amostragem é aplicação de sangue capilar, obtido por exemplo da ponta do dedo ou do calcanhar, em papel filtro que é posteriormente seco. Esse sistema conhecido como *dried blood spot* (DBS) foi descrito pela primeira vez em 1913 por Bang (BANG, 1913). Amostragem por DBS tem sido usada em conjunto com análises por MS desde 1976 quando Mee e colaboradores quantificaram ácidos graxos livres de DBS por ionização química direta (CI) (MEE; KORTH; HALPERN, 1976).

O DBS tem sido utilizado com sucesso e rotineiramente no teste do pezinho que permite o rastreio de diversas doenças metabólicas e endócrinas congênitas (WILCKEN; WILEY, 2008). Esse sistema já foi aplicado a um repertório extenso de analitos, como marcadores inflamatórios e citocinas (NELSON; DAMBROSIA; GREYER; PHILLIPS, 1998), anticorpos (CORRAN; COOK; LYNCH; LEENDERTSE *et al.*, 2008), drogas terapêuticas (MEI; HANNON; DOBBS; BELL *et al.*, 1998) e hormônios (XU; PETTERSSON; BLOMBERG; HEMMILÄ *et al.*, 1992). O DBS já foi empregado na análise de HbA1c, mostrando resultados comparáveis aos das amostras de punção venosa (FOKKEMA; BAKKER; DE BOER; KOOISTRA *et al.*, 2009; MEI; ALEXANDER; ADAM; HANNON, 2001).

Esta abordagem alternativa de obtenção de amostras biológicas apresenta várias vantagens sobretudo na logística de armazenamento e transporte. Para as amostras obtidas por punção venosa, o armazenamento e o envio exigem uma logística sólida incluindo cadeia de refrigeração (ex.: geladeira, freezers, embalagens especiais e gelo seco) que se traduz em custos significativos. Vários estudos apontam que adicionalmente estas amostras possuem estabilidade semelhante ou superior, dependendo do analito e método de processamento, quando comparado às amostras

de sangue coletados por punção venosa (MASTRONARDI; WHITTLE; TUNNINGLEY; NEEMAN *et al.*, 2015; WU; YANG; WANG; LI *et al.*, 2017).

A adsorção e a natureza sólida do DBS tornam os analitos menos reativos do que no sangue. Uma vantagem do DBS, é que os analitos frequentemente exibem excelente estabilidade em condições ambientais, desde que embalados em sacos selados com dessecante, facilitando o processamento e armazenamento das amostras e dispensando a necessidade de aparelhos dedicados, como centrífugas, homogeneizadores, refrigeradores ou freezers (WAGNER; TONOLI; VARESIO; HOPFGARTNER, 2016).

Este tipo de amostragem oferece vantagens significativas relacionadas à coleta. DBS requer apenas punção, de simples execução e pode ser facilmente aprendida até mesmo pelos próprios pacientes além da equipe de enfermagem, ao passo que para coleta de sangue venoso é obrigatório a realização por um profissional flebotomista (FOKKEMA; BAKKER; DE BOER; KOOISTRA *et al.*, 2009; SPOONER; RAMAKRISHNAN; BARFIELD; DEWIT *et al.*, 2010). Embora o processo seja em certa medida invasivo, mostrou-se mais amigável ao paciente mais bem tolerado e menos doloroso do que a punção venosa (MERTON; JONES; LEE; JOHNSTON *et al.*, 2000; WOODS; DOUKETIS; SCHNURR; KINNON *et al.*, 2004).

O volume de sangue coletado neste tipo de abordagem, normalmente é baixo em comparação à amostragem padrão de sangue em tubos. Dependendo da aplicação, o DBS podem ser particularmente interessante quando o volume de sangue é limitado, tais situações incluem recém-nascidos, bebês ou pacientes em estado crítico (BURNETT, 2011; WAGNER; TONOLI; VARESIO; HOPFGARTNER, 2016). Outra vantagem deste tipo de amostragem de matriz seca, é a redução do risco biológico associado ao material, como por exemplo, a diminuição da carga viral do vírus da hepatite B ou eliminação do vírus da imunodeficiência humana (BOND; FAVERO; PETERSEN; GRAVELLE *et al.*, 1981; EVENGARD; VON SYDOW; EHRNST; PEHRSON *et al.*, 1988).

O sistema DBS, contudo, apresenta limitações como tem sido recentemente demonstrado (DE VRIES; BARFIELD; VAN DE MERBEL; SCHMID *et al.*, 2013; FAN; LEE, 2012). Para permitir análises quantitativas são recortadas áreas fixas do DBS

para as análises assumindo assim uma relação entre a área e o volume. No entanto, a distribuição do volume na superfície do papel pode ser alterada em função do hematócrito (Hct). Como o Hct está diretamente relacionado à viscosidade do sangue, uma gota de sangue com Hct alto se espalhará menos no papel filtro, resultando em manchas de menor diâmetro. Conseqüentemente, uma amostra de sangue de Hct alto, conterá uma quantidade maior de sangue e de analito comparada a outra de Hct baixo (DE KESEL; SADONES; CAPIAU; LAMBERT *et al.*, 2013; DENNIFF; SPOONER, 2010). Existe ainda a suposição de que em uma punção DBS como uma amostra volumétrica, o sangue e o analito se espalham homogênea no papel. No entanto, alguns analitos interagem com a matriz do papel resultando em distribuição heterogênea ao longo da mancha. Esse fenômeno é chamado de efeito cromatográfico (LI; TSE, 2010; TIMMERMAN; WHITE; GLOBIG; LÜDTKE *et al.*, 2011).

Recentemente, novas abordagens promissoras que permitem coletar um volume fixo de sangue foram desenvolvidas. Um deles é o dispositivo de microamostragem absorviva volumétrica (VAMS), que permite a coleta direta de um volume preciso de sangue, sem a necessidade de pipetas ou capilares. Esse dispositivo consiste em um manipulador de plástico acoplado a uma ponta polimérica absorvente que, ao ser mergulhada no sangue, absorve um volume preciso (10 µL). Para amostragem de sangue com valor de Hct variando de 0,20 a 0,70, foi demonstrado que o volume de sangue era absorvido independente do Hct. Além disso, quando comparado com os métodos de DBS, a falta de homogeneidade da amostra não é mais um problema, pois toda a ponta é extraída (DENNIFF; SPOONER, 2014; SPOONER; DENNIFF; MICHIELSEN; DE VRIES *et al.*, 2015).

2. Objetivos

O objetivo desse trabalho foi avaliar a combinação da microamostragem volumétrica absorviva com a proteômica por aquisição independente de dados em duas aplicações distintas:

- Análise quantitativa da hemoglobina A1C (HbA1c);
- Identificação de variantes de hemoglobina mais frequentes.

3. Materiais e métodos

3.1. Reagentes e outros materiais

Todos os solventes utilizados foram do mais alto grau de pureza disponível comercialmente, cromatográfico ou LC/MS. Água grau LC/MS, acetonitrila grau LC/MS, ácido fórmico (FA) grau LC/MS, ácido acético grau HPLC foram obtidos da Merck KGaA. Dimetilsulfóxido (DMSO), dodecil sulfato de sódio (SDS), boro-hidreto de tetraetilamônio (TEAB), ácido deoxicólico (DOC), tripsina bovina tratada com 1-tosilamido-2-feniletilclorometilcetona (TPCK), tris, imidazol, dietanolamina, etanolamina, hidróxido de amônio, acetato de amônio e 1-metilpiperazina foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, Estados Unidos). Endoproteinase Glu-C (grau sequenciamento) foi obtida da Roche. O ácido trifluoroacético de grau LC/MS (TFA) e a mistura de calibração do tempo de retenção de peptídeos Pierce RT (PTRC) foram adquiridos na Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, Estados Unidos). Ditioneitol (DTT), iodoacetamida (IA) e bicarbonato de amônio (AmBic) foram adquiridos da Invitrogen™ (Carlsbad, CA, Estados Unidos). As partículas modificadas com carboxilato magnético Sera-Mag foram adquiridas da GE Healthcare (Little Chalfond, Reino Unido). Mitra™ 10 µL foi encomendado à Neoteryx® (Torrance, CA, Estados Unidos). Água ultrapura foi produzida usando o sistema Elga Purelab Flex (High Wycombe, Reino Unido);

Outros materiais utilizados foram: Microtubos de polietileno de 1,5 mL modelo *Protein LoBind* da Eppendorf, (Alemanha). Microplacas de polietileno de 96 poços (*deep-well*) modelo *Protein LoBind* da Eppendorf. Placa magnética *Magnum EX Universal Magnet Plate* (Alpaqua, Beverly, MA, USA).

3.2. Equipamentos

3.2.1. Equipamentos básicos

Foram utilizados no decorrer desse trabalho: agitador modelo ThermoMixer® da Eppendorf; centrífuga modelo 5810 da Eppendorf; espectrofotômetro UV-1800 da Shimadzu (Japão); balança analítica modelo AY220 da Shimadzu; concentrador a vácuo modelo SpeedVac™ Systems da Thermo Scientific™. Todos disponibilizados pelo setor de pesquisa e desenvolvimento do Grupo Fleury (São Paulo, Brasil).

3.2.2. Sistema automatizado

Para o desenvolvimento de um protocolo automatizado, foi utilizado o sistema automatizado Hamilton Robotics Microlab STARlet da Hamilton Company (Estados Unidos). Disponibilizado pelo setor de Pesquisa e Desenvolvimento do Grupo Fleury (São Paulo, Brasil).

3.2.3. Cromatografia semipreparativa

Para o teste de fracionamento de peptídeos, foi utilizado um cromatógrafo líquido de ultra performance modelo Waters ACQUITY UPLC® H-Class Bio equipado a coluna ProSwift™ SAX-1S LC 4,6 × 50 mm PK/SS da Thermo Scientific™ com detectores de ultravioleta (UV) e fluorescência (FLR) acoplado ao robô 215 Liquid Handler da Gilson® Medical Electronics (Estados Unidos), modificado para o fracionamento automatizado da cromatografia. O cromatógrafo foi controlado pelo programa MassLynx™ (Waters) e o robô pelo programa 735. Todos disponibilizados pelo setor de Pesquisa e Desenvolvimento do Grupo Fleury (São Paulo, Brasil).

3.2.4. Sistema de nano cromatografia líquida acoplado a espectrômetro de massa e ionização nanoelectrospray (nLC-MS)

Todas as análises por nLC-MS foram realizadas utilizando nanocromatógrafo líquido (nLC) modelo UltiMate™ 3000 RSLCnano da Thermo Scientific acoplado ao espectrômetro de massas híbrido quadrupolo-orbitrap Q Exactive™ HF-X da Thermo Fisher Scientific com ionização por nanoelectrospray (fonte EASY-Spray™) equipado com a coluna EASY-Spray™ LC C18, 2 µm, 300A, 150 µm x 15 cm da Thermo Fisher Scientific. O sistema foi disponibilizado pelo setor de Pesquisa e Desenvolvimento do Grupo Fleury e a aquisição dos dados foi obtida pelo programa Xcalibur™.

3.3. Amostras biológicas

Este projeto foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa do Grupo Fleury sob o número 02241818.4.0000.5474 (Anexo A). Amostras de sangue colhidas com anticoagulante EDTA como parte de protocolos diagnósticos padrão que normalmente seriam descartados foram utilizadas nesta investigação. Nesses casos, as amostras foram descaracterizadas, pela remoção das informações que possibilitem a

identificação do paciente e codificadas. Somente os níveis de HbA1c ou o tipo de variante de hemoglobina foram mantidos nos registros.

Ao todo, 132 amostras de sangue total com EDTA previamente avaliadas para hemoglobinopatias e quantificações da HbA1c foram incluídas neste estudo. O protocolo de rotina para caracterização de hemoglobinopatias foi baseado em eletroforese capilar de zona (CZE) seguida de cromatografia líquida de alta eficiência de troca catiônica (CX-HPLC). As análises por CZE foram obtidas no equipamento *Capillarys 2 Flex Piercing System* (Sebia, Lisses, França), que inclui processamento automatizado para hemólise, separação baseada em mobilidade eletroforética e detecção espectrofotométrica em 415 nm. A identificação de variantes dentro de zonas definidas foi obtida usando o programa *Phoresis* (versão 9.3.0). Já as análises por CX-HPLC foram realizadas no equipamento *Variant II Hemoglobin Testing System* (Bio-Rad, Hercules, CA, Estados Unidos) equipado com o kit β -Thalassemia Short Program o programa CDM 5.1.1. O protocolo de rotina para a quantificação da HbA1c das amostras usadas neste estudo foi realizado a partir do sistema automatizado de HPLC, D-100 (Bio-Rad).

Após o período de guarda (1 a 4 dias), as amostras mantidas sob refrigeração, foram aplicadas em dispositivos de microamostragem volumétrica absorviva (Mitra™ 10 μ L Neoteryx®) secas por 4 horas em temperatura ambiente, armazenadas em sacos de polipropileno contendo dessecante de sílica e colocadas em freezer -80 °C. Amostras pareadas de sangue total venoso e capilar foram coletadas de voluntário após consentimento informado. Amostras de sangue venoso foram coletadas em tubos BD Vacutainer contendo ácido etilenodiaminotetracético como anticoagulante. Após homogeneização por inversão, alíquotas de 10 μ L foram colocadas em dispositivos Mitra™ 10 μ L. O sangue capilar total foi obtido por picada no dedo usando lancetas BD Microtainer Quickheel™ (Becton Dickinson Vacutainer Systems, Franklin Lakes, NJ) e o sangue foi coletado diretamente em dispositivos Mitra™ 10 μ L colocando a ponta de amostragem na gota de sangue e permitindo que a ponta ficasse totalmente vermelha. Os dispositivos Mitra™ 10 μ L foram deixados secar ao ar por 4 horas em temperatura ambiente e, assim, embalados em sacos de polipropileno selados contendo sachês dessecantes de sílica e mantidos em temperatura ambiente por até 7 dias.

As amostras foram divididas em dois grupos, a partir de cada objetivo do trabalho:

- a) **GRUPO A – Análise quantitativa da hemoglobina HbA1c (95 amostras):** para essa aplicação, amostras de indivíduos sem a presença de variantes de hemoglobina que foram analisadas em rotina para a quantificação da HbA1c foram utilizadas. Os parâmetros de exatidão, precisão, linearidade e limite de quantificação foram avaliados no método de quantificação por DIA desenvolvido.
- b) **GRUPO B – Identificação de variantes de hemoglobina mais frequentes (37 amostras):** para essa aplicação, amostras de indivíduos com as principais variantes conhecidas, descritas pelo banco de dados da Uniprot foram analisadas.

Não houve critérios para a seleção ou exclusão de amostras.

3.4. Métodos

3.4.1. Preparação de amostra

Os dispositivos Mitra™ 10 µL foram transferidos para um Mitra 96-Autorack™ vazio, e o suporte foi colocado em uma placa de polipropileno de 96 poços profundos (Eppendorf) contendo 250 µL de bicarbonato de amônio em água (25 mM) com 0,5% de ácido deoxicólico em água. As proteínas foram extraídas por incubação em *ThermoMixer®* (Eppendorf) a 1000 rpm e 37 °C por 45 minutos, as pontas dos dispositivos Mitra™ 10 µL foram removidas e os extratos proteicos armazenados a -80 °C até o processamento posterior.

Um método automatizado de preparação de amostra baseado em esferas magnéticas adaptado de um protocolo descrito anteriormente foi usado para redução de proteína, alquilação e digestão triptica (CARDOZO; LEBKUCHEN; OKAI; SCHUCH *et al.*, 2020). As etapas seguintes de preparação de amostra foram implementadas em um sistema de manipulação de líquidos *Hamilton Robotics Microlab STARlet* (Hamilton Company, Reno, NV, EUA). A programação e a operação foram realizadas usando o programa *Hamilton Robotics Venus Three*. Cinquenta microlitros de extrato

de proteína foram transferidos para uma placa de 96 poços de profundidade LoBind seguido pela dispensação de 50 µL de suspensão de partículas magnéticas modificadas com carboxila Sera-Mag em água a 1 mg/mL e 280 µL de etanol, incubados com agitação de 1000 rpm por 10 min em temperatura ambiente. As amostras foram reduzidas com a adição de um tampão de lise (1% SDS, 5 mM DTT em 50 mM TEAB pH 8,5) a 85 °C, sob agitação de 2000 rpm por 20 min. Foram dispensados 10 µL de IA 10 mM em água e a mistura foi mantida à temperatura ambiente durante 15 minutos para alquilação.

A placa foi transferida para uma *Magnum EX Universal Magnet Plate* (Alpaqua) por 5 min e o sobrenadante descartado. Os grânulos imobilizados foram lavados uma vez com 800 µL de etanol a 80% em água e duas vezes com 200 µL de etanol a 80% em água. Uma solução de tripsina tratada com TPCK (75 µL a 65 µg/mL) em AmBic 50 mM em água foi dispensada e a placa foi incubada a 37 °C, 1000 rpm por 4 h. As digestões trípticas foram acidificadas pela adição de 5 µL de TFA 10% em água seguida de uma breve agitação. As esferas foram imobilizadas em um suporte magnético e as digestões trípticas foram transferidas para uma placa 96 poços (Protein LoBind Deepwell 96/500 µL) e foi dispensado em cada poço a mistura de calibração de peptídeos PRTC a uma concentração final de 50 fmol/µL. A placa alvo foi removida do manipulador de líquido robótico, selada com selo de alumínio e mantida a -20 °C até a análise por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas sequencial (LC-MS/MS).

3.4.1.1. Protocolo IFCC para preparação de amostra

Foi utilizado como base de nossos experimentos iniciais o protocolo de preparação de amostra da IFCC (MOSCA; GOODALL; HOSHINO; JEPPSSON *et al.*, 2007). O protocolo consiste em matriz de lavado de hemácias hemolisado, incubados com solução salina a fim de remover a pré-HbA1c, tratada com a endoproteínase Glu-C para a obtenção dos hexapeptídeos N-terminais da cadeia beta que são então analisados por LC-MS/MS.

3.4.1.2. Avaliação da tripsina como alternativa à endoproteinase Glu-C

Três protocolos de preparo de amostra (sangue em EDTA) tendo como base o protocolo padronizado da IFCC foram testados. No primeiro as amostras foram tratadas com endoproteinase Glu-C como no protocolo da IFCC. No segundo protocolo, foi mantido a digestão com a enzima endoproteinase Glu-C e foram adicionadas etapas de redução e alquilação. A etapa de redução foi realizada com 6 μL de DTT à 50 mM em água, incubação a 60 °C sob agitação de 400 rpm por 30 minutos e a etapa de alquilação foi feita com 3 μL de IA à 500 mM durante 30 minutos em temperatura ambiente protegido de luz. No terceiro protocolo, as etapas de redução e alquilação foram adicionadas conforme descrito no protocolo 2. No entanto, neste caso, a enzima de digestão utilizada foi a tripsina, como alternativa a enzima originalmente empregada no protocolo da IFCC, a endoproteinase Glu-C. A digestão foi feita com tripsina à 1 mg/mL e incubação a 37 °C por 4 horas.

Após as digestões, os extratos peptídicos foram acidificados com TFA 10% em água a fim de interromper as atividades enzimáticas e analisados por LC-MS/MS.

3.4.2. Análise por LC-MS/MS

Todas as análises por LC-MS/MS foram realizadas em um sistema UltiMate 3000 Nano LC conectado a um espectrômetro de massas Q-Exactive HF-X (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Alemanha) equipado com uma fonte EASY-Spray operando em modo positivo. O cromatógrafo foi equipado com uma pré-coluna de captura de amostra PepMap100 C18 5 μm , 0,3 \times 5 mm e uma coluna analítica PepMap RSLC C18 2 μm , 150 μm \times 15 cm (Thermo Fisher Scientific). Foram injetados 2 μL de extratos trípticos, carregados no sistema nLC aplicando o método de amostragem *microliter pickup* usando 0,1% de TFA em água como líquido de transporte, com fluxo de 100 $\mu\text{L}/\text{min}$ e trapeados por 2 minutos.

Para a separação cromatográfica, a vazão foi de 1,2 $\mu\text{L}/\text{min}$, e a coluna foi mantida a 45 °C; sendo o solvente A: 1% DMSO, 0,1% de ácido fórmico em água grau LC/MS e B: 1% DMSO, 0,1% de ácido fórmico em acetonitrila grau LC/MS. Um gradiente linear de 20 min foi empregado para as análises: 6% B por 4 minutos, 6-

20% B por 15 min, 20-85% B por 2 min. Os parâmetros da fonte utilizados foram: voltagem de spray = 2,2 kV, temperatura capilar = 275 °C e nível de RF de lente S = 50. O sinal em m/z 401,92272 de DMSO foi usado como referência. O programa Xcalibur (versão 4.2.47, Thermo Fisher Scientific) foi usado para aquisição de dados e controle do instrumento.

Os experimentos por DDA foram realizados compreendendo a aquisição de um espectro de massas de varredura completa de m/z 350 a 1650 com 120.000 resolução de massa (em m/z 200), controle automático de ganho (AGC) definido para para 3×10^6 com uma injeção máxima tempo (maxIT) de 60 ms. Os 15 picos mais abundantes correspondentes foram selecionados para MS/MS. Os espectros de MS/MS foram adquiridos com resolução de massa de 15.000 (em $m/z = 200$) com uma janela de isolamento de 1,6 m/z , AGC definido para 2×10^5 com um maxIT de 60 ms. Dissociação colisional de alta energia (HCD) foi alcançada com nitrogênio como o gás de colisão e energia de colisão normalizada (NCE) de 27%. A exclusão dinâmica foi aplicada por 20 s e a detecção de isótopos foi habilitada para excluir todos os isótopos de um cluster.

Os experimentos DIA foram realizados alternando uma varredura completa de m/z 360 a 900 com resolução de massa de 60.000, seguida por 16 varreduras MS/MS com janelas de isolamento de precursor de 25 m/z , com resolução de 15.000, AGC alvo 5×10^5 , maxIT 55 ms com NCE de 27%. As janelas de isolamento foram otimizadas pelo programa Skyline e cobertas de m/z 350 a 800 usando uma janela de sobreposição de 0,5 m/z .

3.4.3. Teste de fracionamento dos peptídeos por cromatografia de troca aniônica

A partir dos extratos obtidos no teste de digestão descrito no item 3.4.1.2 quanto à alternativa do uso da tripsina como enzima proteolítica frente ao uso da endoproteínase Glu-C, foi produzido um pool com os digestos da condição 1 (digestão por Glu-C) e outro com os digestos da condição 3 (digestão por tripsina, após as etapas de redução e alquilação) - estes selecionados após análise por LC-MS/MS, de acordo com os melhores resultados prévios em relação a intensidade dos sinais espectrais e por representarem as condições mais adversas do estudo, resultando em

dois *vials* com um total de 64 μ L de amostra em cada um para o teste de fracionamento.

O *pool* obtido foi fracionado um sistema de biocromatografia líquida de ultra performance (BioUPLC) modelo Waters ACQUITY UPLC®H-Class, com coluna ProSwift™ SAX-1S LC 4,6 \times 50 mm PK/SS (*Thermo Fisher Scientific*), de troca aniônica eluída com um gradiente de pH produzido pela combinação linear de 100% do tampão A (piperazina, Tris, imidazole, dietanolamina, etanolamina, metilpiperazina, todos a 10 mM e ajustado ao pH 9 com hidróxido de amônio) a 100% do tampão B (piperazina, Tris, imidazole, dietanolamina, etanolamina, metilpiperazina, todos a 10 mM e ajustado ao pH 3,5 com ácido fórmico) em 15 minutos a um fluxo de 0,95 mL/min. Um volume de 50 μ L foi injetado e as frações de 0,7 minutos foram coletadas em placa de polipropileno de 96 poços profundos (Eppendorf) por meio de um pipetador Gilson 215 modificado como coletor de frações e acoplado à saída do detector de fluorescência. Um total de 24 frações foram coletadas. As placas foram totalmente evaporadas em speedvac e reconstituídas com 50 μ L de ácido trifluoracético 0,1% e acetonitrila 3% em água.

3.4.3.1. Análise das frações por DDA

Para o teste de fracionamento, foram mantidas as condições cromatográficas descritas no item 3.4.2 em um modo de aquisição dependente de dados (DDA) top 15 onde o espectrômetro alternou entre (1) aquisições de varredura sem seleção pelo quadrupolo a uma resolução de 120.000, AGC target de 3×10^6 , maximum IT de 60 ms no intervalo de 350 a 1650 m/z; (2) seguidas de até 15 eventos de MS/MS a uma resolução de 15.000, AGC target de 2×10^5 e maximum IT de 60 ms com uma janela de isolamento de 1,6 m/z e com energia normalizada de colisão de 27 eV.

3.4.4. Processamento de dados: identificação de variantes de hemoglobina e criação de uma biblioteca FASTA

Os dados brutos do DDA foram convertidos para o formato mzML usando msConvert (ProteoWizard) e analisados por meio do Trans-Proteomic Pipeline (DEUTSCH; MENDOZA; SHTEYNBERG; FARRAH *et al.*, 2010). Os dados foram pesquisados no banco de dados UniProtKB / Swiss-Prot (baixado em novembro de

2021) com sequências *decoy* adicionadas usando o Comet. Os critérios de pesquisa incluíram carbamidometilação de cisteína como uma modificação fixa, oxidação de metionina e glicação de proteína N-terminal como modificações variáveis, digestão de tripsina permitindo uma clivagem perdida e tolerância para o erro de massa do precursor foi de 5 ppm. Os resultados foram então processados pelo PeptideProphet seguido do iProphet usando uma probabilidade de 0,99. O *interact.pep.xml* combinado foi usado para construir a biblioteca espectral de sangue total capilar por BiblioSpec no Skyline. A biblioteca espectral empírica continha 1210 entradas precursoras.

Um banco de dados FASTA de hemoglobinas selvagens e variantes foi produzido com sequências de subunidades alfa de hemoglobina (P69905), beta (P68871), delta (P02042), gama 1 (P69891), gama 2 (P69892) e as variantes naturais para as subunidades alfa e beta descritas em Banco de dados UniProtKB / Swiss-Prot. As posições das mutações e as substituições ou deleções de todas as variantes descritas para as duas proteínas foram exportadas para uma planilha que incorporou uma fórmula para a geração das sequências modificadas. As sequências geradas juntamente com os códigos numéricos das variantes foram exportadas como texto e importadas no programa Skyline com o propósito de prever peptídeos trípticos usando as seguintes configurações: uma clivagem de digestão de tripsina perdida, mínimo de 6 resíduos, máximo de 40 resíduos e glicação de proteína N-terminal como modificação variável. Peptídeos repetidos foram excluídos a fim de manter apenas as sequências completas de hemoglobina alfa e beta, enquanto as variantes continham apenas peptídeos trípticos teóricos contendo variação de aminoácidos. ProSIT (GESSULAT; SCHMIDT; ZOLG; SAMARAS *et al.*, 2019) integrado ao Skyline foi usado para prever espectros de MS/MS para os peptídeos não incluídos na biblioteca espectral empírica. O precursor com 1 a 3 cargas foi habilitado e para a predição de espectros de HCD foi definida uma energia de colisão normalizada de 30%. O programa ProSIT também foi usado para previsão de tempos de retenção usando peptídeos trípticos das cadeias alfa de Hb (HBA) e cadeia beta de Hb (HBB).

Os dados brutos do DIA foram importados e processados diretamente no Skyline. Os peptídeos precursores foram selecionados de 2 a 4 cargas e filtrados com 4 picos de isótopos. As transições de fragmentos foram escolhidas automaticamente da biblioteca. Cinco íons mais intensos e 1 clivagem perdida por tripsina foi permitida.

A previsão do tempo de retenção foi habilitada usando a calculadora de previsão Prosit com janela de tempo de 3 minutos. A tolerância de correspondência de íons foi definida para 0,05 m/z com áreas de pico restritas a apenas íons de fragmento do tipo y. Os dados foram revisados manualmente para garantir a detecção e integração correta do pico. Apenas picos com valor de produto de ponto de isótopo acima de 0,9 foram incluídos.

3.4.5. Processamento de dados: quantificação de HbA1c

Para determinações quantitativas de HbA1c, os peptídeos de hemoglobina beta N-terminal não glicosilados (VHLTPEEK) e glicosilados (glic-VHLTPEEK) foram quantificados pela soma das áreas integradas de seu precursor e íon produto. N-terminal não glicosilado (VHLTPEEK) foi definido como padrão substituto no Skyline para estabelecer a glicosilação. Os dados brutos foram importados e processados no Skyline sem nenhuma transformação matemática e a integração de pico foi revisada individualmente. A quantificação foi realizada por meio de uma curva de calibração com os seguintes pontos de concentração: 4,8; 5,9; 6,8; 8,0; 9,0; 10,5; 12,6 e 15,2% de HbA1c (29,3; 40,9; 50,6; 64,0; 75,0; 91,8; 114,5 e 142,6 mmol de HbA1c/mol de Hb). O ajuste de regressão foi ajustado para linear, sem ponderação de regressão e MS1 e MS2 foram avaliados separadamente. Duas amostras de controle de qualidade com concentrações de 5,6 e 9,7% de HbA1c (38,0 e 83,0 mmol de HbA1c/mol de Hb) foram incluídas em cada execução.

3.4.6. Validação do método de quantificação por DIA

A imprecisão do método foi estimada utilizando 3 *pools* de sangue total que foram preparados a partir de pacientes com níveis de concentração de HbA1c baixo, médio e alto. Os *pools* baixo, médio e alto resultantes foram analisados em duplicata durante 5 dias consecutivos. As imprecisões totais foram calculadas no programa EP Evaluator v12 (Data Innovations; South Burlington, VT). A linearidade foi avaliada testando 10 concentrações (variando de 4,4 a 14,4 % de HbA1c) produzidas pela combinação de diferentes proporções de um *pool* alto de pacientes com um *pool* baixo de pacientes. Cada concentração foi avaliada em triplicata e os dados foram analisados no programa EP Evaluator v12 por meio do módulo *EP6 Linearity*. O limite de quantificação (LOQ) foi estimado analisando 5 amostras com baixas concentrações

ao longo de 10 dias. Os dados foram avaliados utilizando o programa EP Evaluator v12 com base em uma projeção da concentração mais baixa resultando em um CV <20%. As comparações de métodos foram realizadas usando amostras previamente descaracterizadas quantificadas por sistema automatizado HPLC D-100 (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA) certificado pelo NGSP. Os resultados foram analisados no programa EP Evaluator v12 (Data Innovations; South Burlington, VT) por meio do módulo de comparação de método alternativo (quantitativo). A regressão de Deming e o bias obtido foram analisados para a comparação dos métodos. Essas amostras foram testadas simultaneamente usando uma curva de calibração e amostras de controle de qualidade do programa IFCC.

O estudo de estabilidade utilizou sangue total venoso e capilar em dispositivos VAMS armazenados em temperatura ambiente por 3 e 7 dias. Todas as condições foram testadas em triplicata na mesma execução e os testes *t* foram realizados entre cada condição e os controles armazenados em sacos plásticos selados com dissecante a -80 °C.

4. Resultados e discussão

4.1. Preparação de amostra alternativa ao protocolo IFCC

A forma hemoglobina A1C refere-se apenas a glicação no N-terminal (Val-1) da cadeia beta da molécula (SACKS; ARNOLD; BAKRIS; BRUNS et al., 2011). A enzima proteolítica endoproteinase Glu-C cliva a proteína preferencialmente em ácido aspártico “E” e com menor afinidade em ácido glutâmico “D” (DRAPEAU; BOILY; HOUMARD, 1972). Na Figura 2, é indicado com marcação amarela, o peptídeo de interesse para a determinação da glicação de acordo com o protocolo IFCC.

```
MVHLTPEKSAVTALWGKVNVDVGGGALGRLLVYPWTQRFFESFGDLSTPDAVMGNPKVKAHGKKVLGA  
FSDGLAHLNLDKGTFFATLSELHCDKLVDPENFRLLGNVLVLCVLAHFGKEFTPPVQAAYQKVVAGVANALAH  
KYH
```

Figura 2. Fasta da hemoglobina, subunidade beta com destaque no peptídeo N-terminal gerado a partir da digestão pela endoproteinase Glu-C. Fonte: <https://www.uniprot.org/uniprot/P68871>

O protocolo original IFCC monitora exclusivamente os dois peptídeos de interesse: VHLTPE (não glicado) e glic-VHLTPE (glicado) por meio de monitoramento de íon selecionado (SIM) em instrumentos com analisadores de resolução unitária. Na nossa versão adaptada, a detecção é feita em equipamentos de alta resolução e os dois peptídeos são detectados nas suas formas duplamente carregadas respectivamente nos m/z s 348,1898 e 429,2162 e são incorporados na detecção os isotopólogos correspondentes M, [M+1] e [M+2].

A preparação de amostra sugerida pela IFCC compreende três principais etapas: isolamento dos eritrócitos seguida por hemólise - onde são lavados com salina, incubados para a remoção da pré-HbA1c e hemolisados com água – a digestão enzimática pela endoproteinase Glu-C com incubação *overnight* e por último, análise dos peptídeos (Figura 3). Todo esse processo leva em torno de 2 dias de preparação das amostras, totalizando cerca de 30 horas até a análise por LC-MS/MS. Além da preparação demorada, a digestão da hemoglobina pela protease Glu-C, resulta em peptídeos maiores quando comparado à tripsina, comprometendo nossa análise de processamento e cobertura espectral da proteína.

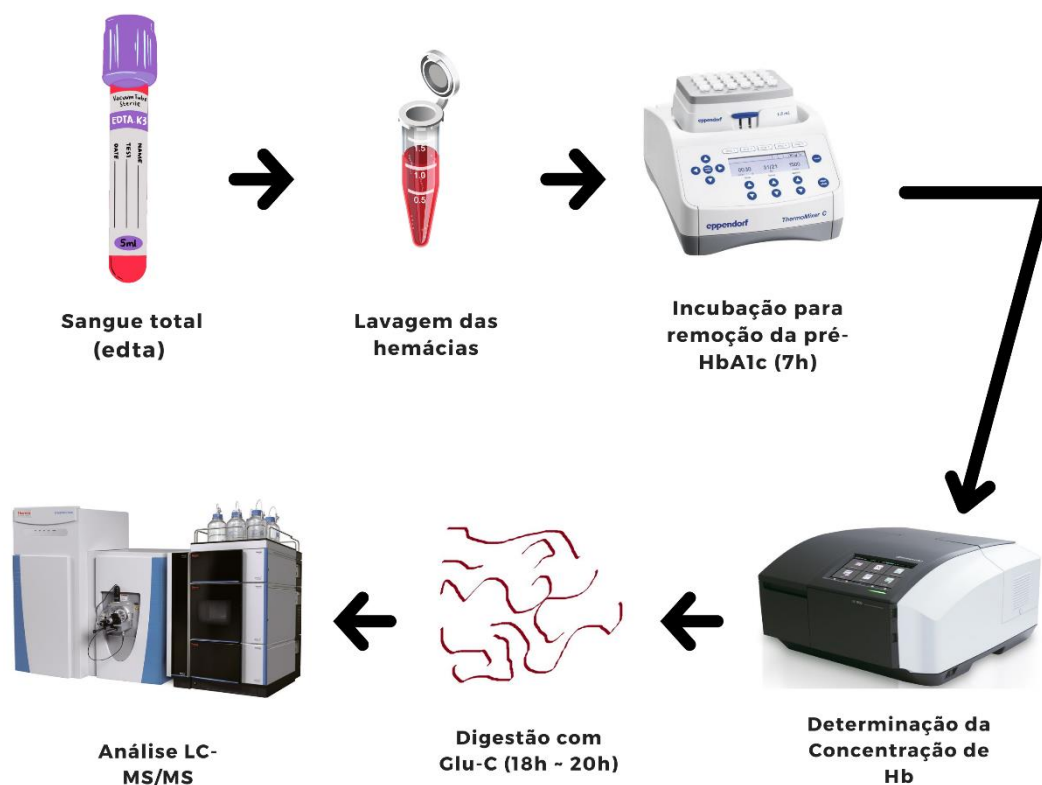


Figura 3. Protocolo de preparação de amostra padronizado segundo a Federação Internacional de Química Clínica (IFCC) para determinação da hemoglobina glicada HbA1c.

4.1.1. Avaliação da tripsina como alternativa à endoproteínase Glu-C e o uso de VAMS como alternativa à coleta de sangue venoso na preparação da amostra

No teste de avaliação da tripsina como protease alternativa à Glu-C, foram testadas três condições distintas de preparação de amostra, visando uma maior cobertura espectral, melhora no sinal e sensibilidade do método, a partir da inclusão das etapas de redução e alquilação, além da digestão triptica. A condição 3 testada, apresentou maior quantidade de peptídeos gerados, com melhora na cobertura proteica e no perfil de fragmentação por MS2 e boa intensidade do sinal. Com exceção dos hexapeptídeos N-terminais da cadeia beta da Hb, os demais produtos da proteólise por Glu-C não apresentavam características adequadas para a detecção. Desta forma, foi adotada em nossos experimentos a tripsina, já bem documentada como a principal protease em proteômica (WIŚNIEWSKI; ZOUGMAN; NAGARAJ; MANN, 2009). Além disto, E como a intenção era a inclusão do maior número possível

de peptídeos das cadeias alfa e beta da Hb foi adaptado um protocolo incluindo as etapas de redução e alquilação das cisteínas.

A nossa estratégia avaliada também buscou a simplificação no preparo da amostra a partir da automação pelo uso de robôs pipetadores, ganhando em praticidade e padronização da análise. A abordagem de matriz seca aproveita a imobilização das proteínas na ponta do dispositivo VAMS para a remoção de sais e metabólitos de baixo peso molecular além da remoção da glicose, que resulta na eliminação da pré-HbA1c sem a necessidade de longas incubações.

Durante a manipulação de matrizes de sangue líquido que apresentavam variantes de Hb, notamos hemólise recorrente nestes materiais, muito provavelmente devido à condição das hemácias fragilizadas e seu conteúdo instável (EBERLE; TORRES, 2017). Isso foi um grande dificultador no início dos testes durante as lavagens sugeridas pelo protocolo da IFCC, implicando na perda do material significativo para as etapas posteriores.

Para avaliar a eficiência de extração de proteínas das pontas VAMS, as seguintes variáveis foram investigadas: concentração de ácido deoxicólico e tempo no thermomixer a 1000 rpm e 37 °C. A combinação de ácido deoxicólico 0,5% por 40 minutos de incubação mostrou-se eficiente. Após a remoção das pontas do VAMS, obteve-se um volume final de 50 µL de extrato proteico. As coordenadas da amostra foram exportadas para o manipulador de líquidos robótico que executou todas as etapas restantes.

O processamento automatizado da proteômica foi implementado através da modificação de um protocolo previamente desenvolvido pelo nosso grupo (CARDOZO; LEBKUCHEN; OKAI; SCHUCH et al., 2020). Os extratos proteicos foram transferidos para outra microplaca, combinados com esferas magnéticas e sequencialmente submetidos à redução e alquilação. As partículas então capturaram as proteínas por precipitação com etanol e as lavagens com etanol 80% removeram o excesso dos reagentes permitindo a obtenção de um material altamente enriquecido e limpo para posterior análise por nLC-MS. Um dos passos mais demorados nos protocolos de proteômica é a etapa de digestão. Neste estudo, essa etapa foi otimizada e reduzida para 4 h sem perda de sensibilidade dos peptídeos da

hemoglobina. Ao todo, o protocolo otimizado teve um ganho de aproximadamente 23 horas de preparação de amostra quando comparado ao protocolo IFCC, se tornando uma opção viável de aplicação na rotina de laboratórios clínicos.

4.2. Análise por LC-MS/MS

A análise empregando o protocolo padronizado neste estudo permitiu a identificação das cadeias alfa e beta da Hb. Os peptídeos trípticos obtidos apresentaram uma boa cobertura espectral e ótimo perfil de fragmentação com detecção em MS e MS2, gerando íons produtos (fragmentos) de classe y e b. A tripsina cliva a proteína preferencialmente nos aminoácidos de arginina (R) e lisina (K) conforme demonstrado nas figuras 4 a 7.

```
MVLSPADKTNVKAAWGKVGAHAGEYGAEALERMFVLSFPTTKTYFPHFDLSHGSAQVKGHG  
KKVADALTNVAHVDDMPNALSALSSDLHAHKLRVDPVNFKLLSHCLLVTLAAHLPAEFTP  
AVHASLDKFLASVSTVLTSKYR
```

Figura 4. Sequência FASTA da cadeia alfa da hemoglobina com destaque nos aminoácidos arginina (R) e lisina (K) clivados pela protease tripsina. **Fonte:** <https://www.uniprot.org/uniprot/P69905.fasta>

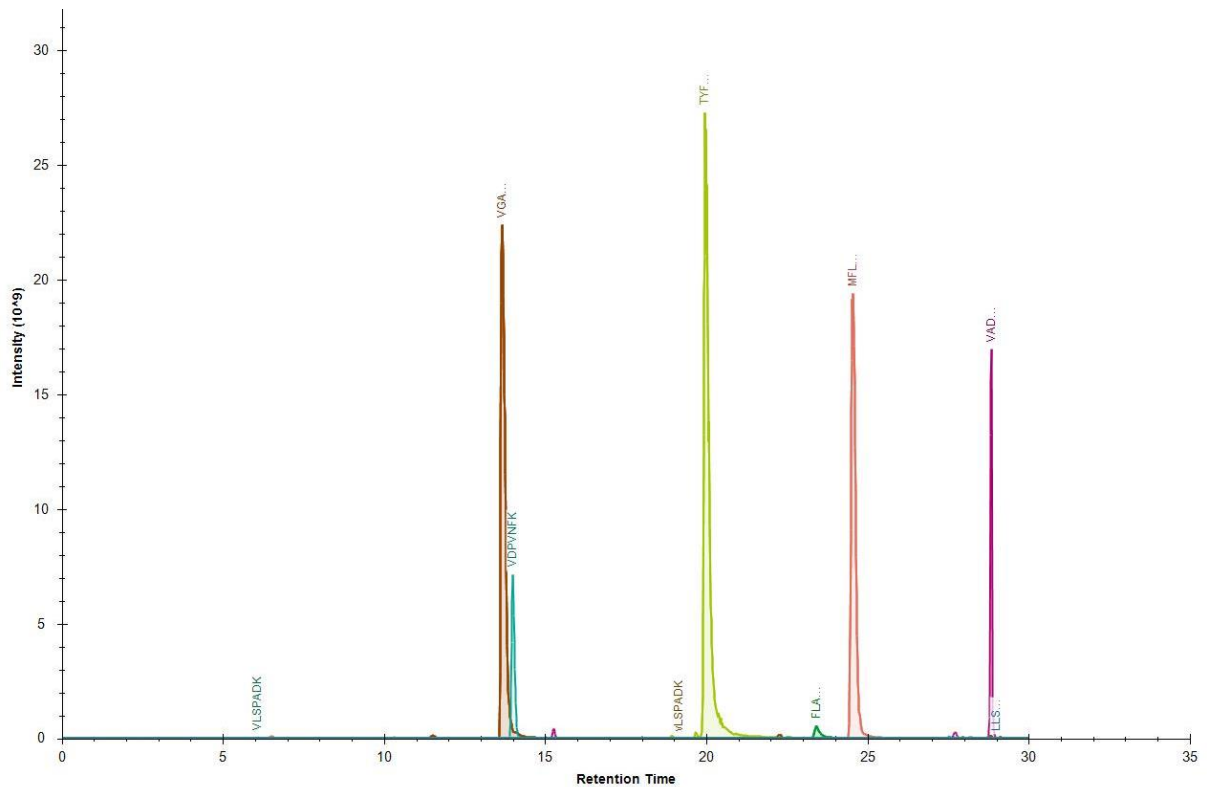


Figura 5. Cromatogramas extraídos de aquisição independente de dados correspondentes às coordenadas de relação massa/carga dos peptídeos trípticos da cadeia alfa Hb.

```

MVHLTPEEKSAVTALWGKVNVDEVGGEALGRLLVVYPWTQRFFESFGDLSTPDAVMGNPKV
KAHGKKVLGAFSDGLAHLDNLKGTFATLSELHCDKLHVDPENFRLLGNVLCVLAHHFGKE
FTPPVQAAYQKVVAGVANALAHKYH

```

Figura 6. Sequência FASTA da cadeia beta da hemoglobina com destaque nos aminoácidos arginina (R) e lisina (K) clivados pela protease tripsina. Em vermelho, sinalizado o peptídeo N-terminal que contém a glicação. **Fonte:** <https://www.uniprot.org/uniprot/P68871.fasta>

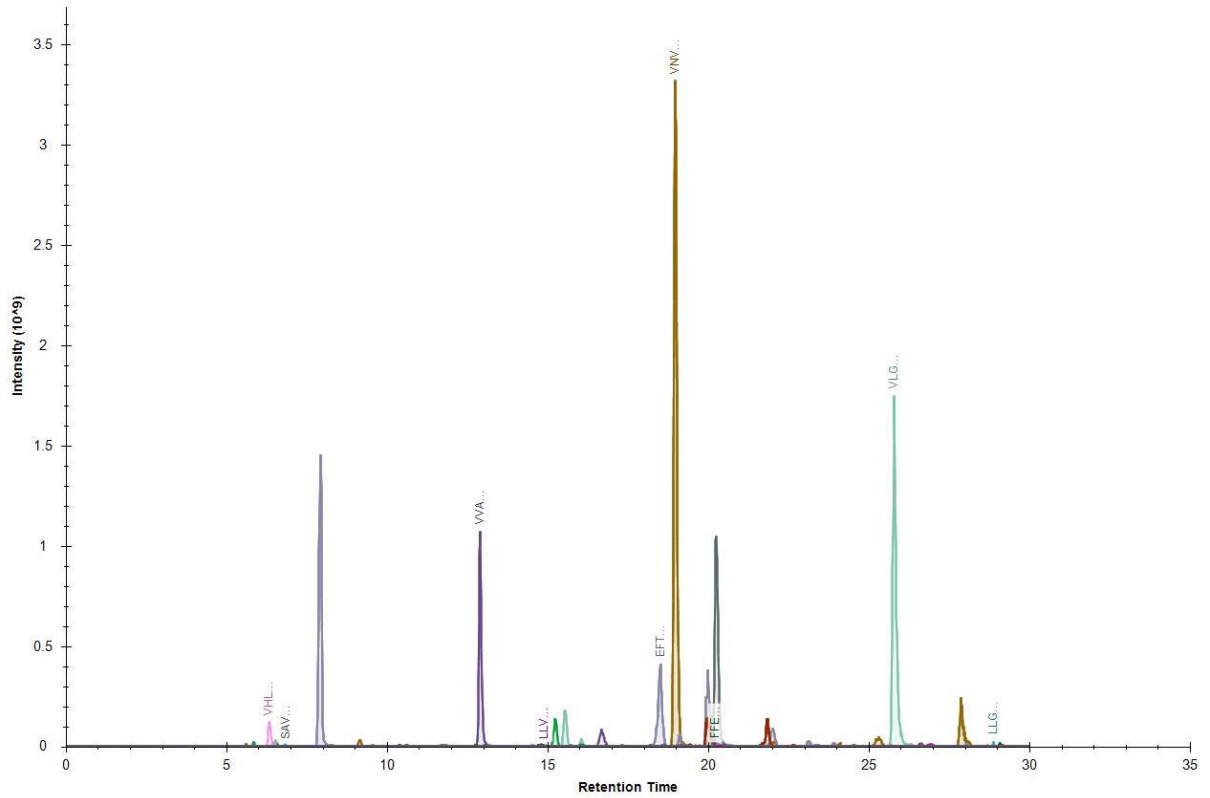


Figura 7. Cromatogramas extraídos de aquisição independente de dados correspondentes às coordenadas de relação massa/carga dos peptídeos tripticos da cadeia beta Hb.

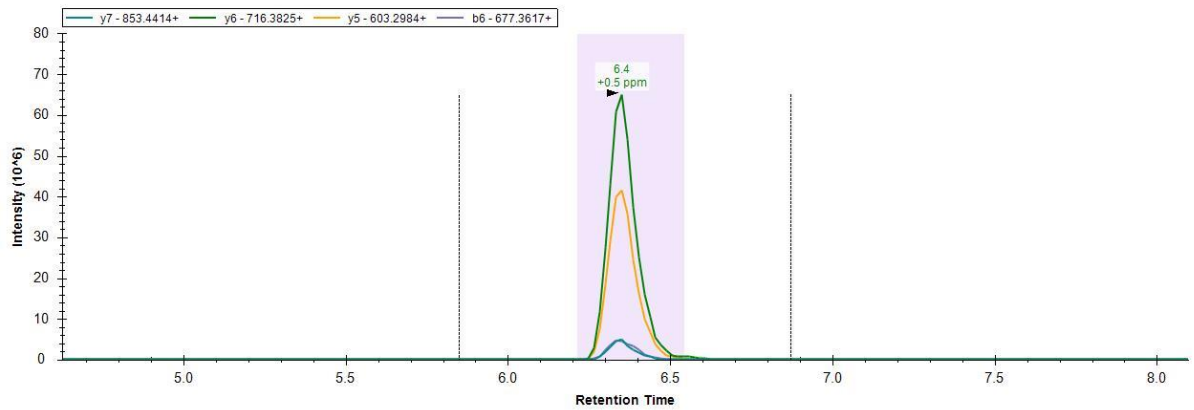
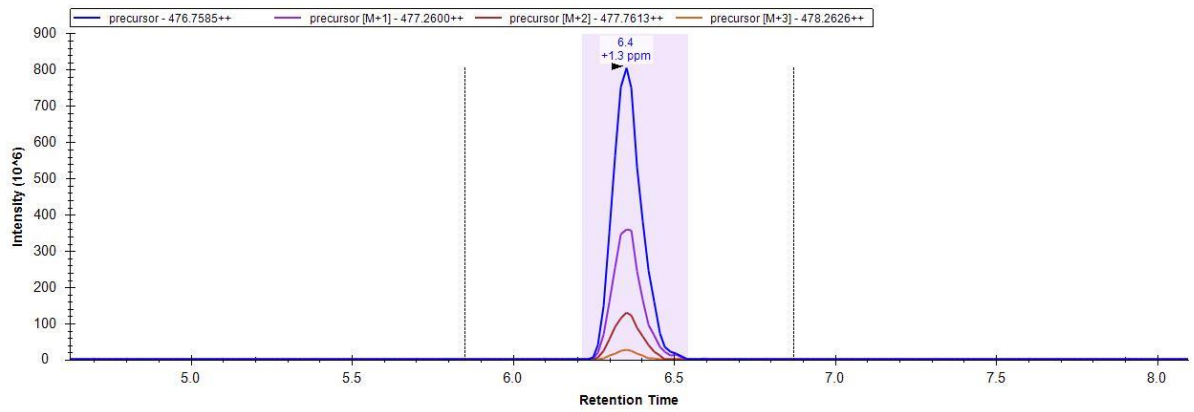


Figura 8. Cromatogramas extraídos de aquisição independente de dados correspondentes às coordenadas de relação massa/carga do peptídeo tríptico N-terminal da cadeia beta hemoglobina - VHLTPEEK não glicado, com íons precursoros do peptídeo e seus íons produtos.

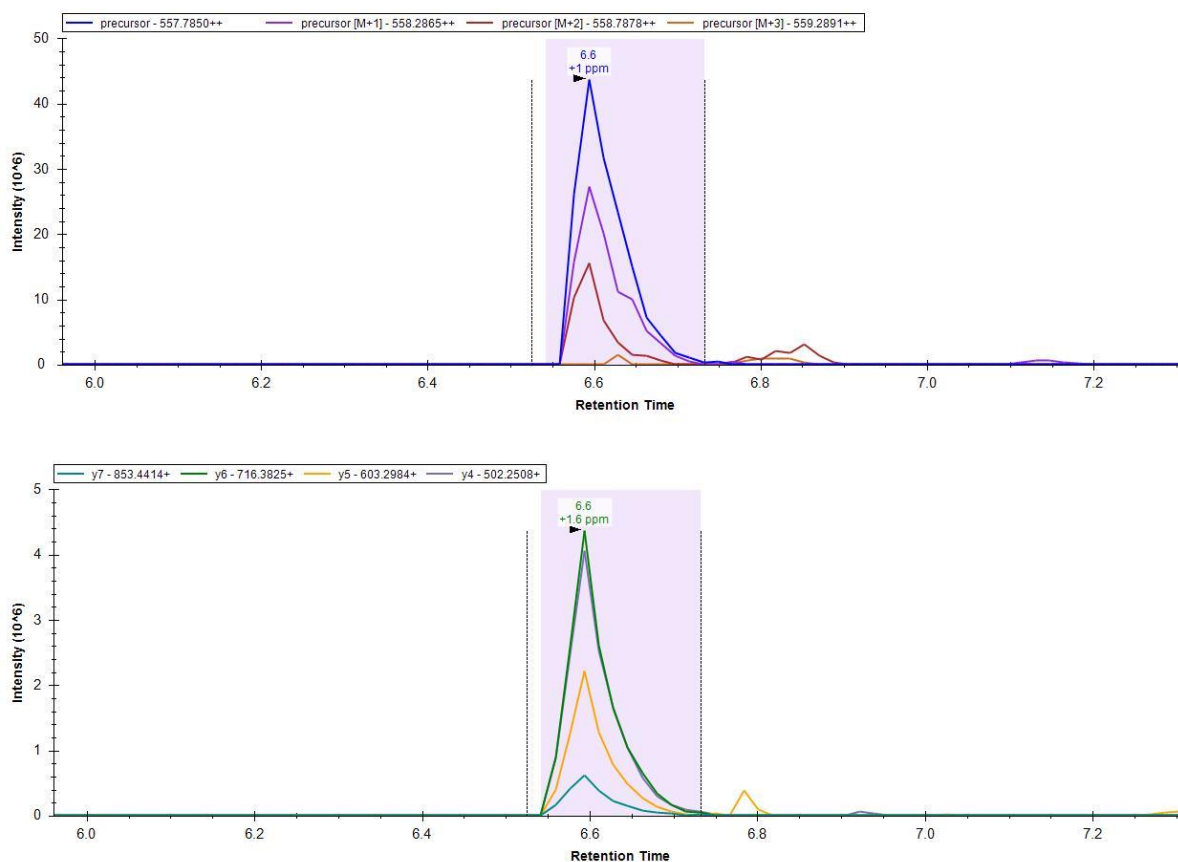


Figura 9. Cromatogramas extraídos de aquisição independente de dados correspondentes às coordenadas de relação massa/carga do peptídeo tríptico N-terminal da cadeia beta hemoglobina - VHLTPEEK glicado, com íons precursoros do peptídeo e seus íons produtos.

4.3. Teste de fracionamento dos peptídeos por cromatografia de troca aniônica para construção de uma biblioteca espectral

Para a identificação e detecção do maior número possível de peptídeos provenientes das proteólises das cadeias alfa e beta da Hb foi realizado um fracionamento *offline* por meio de cromatografia de troca aniônica resultando em 24 frações que foram processadas conjuntamente por ferramentas de atribuição espectro-peptídeo. Essa estratégia permitiu a identificação de 200 proteínas com alto grau de confiabilidade pela métrica de validação de inferência proteica do PeptideShaker quando buscado contra o banco UniProtKB / Swiss-Prot completo. Isso resultou em coberturas proteicas das cadeias alfa e beta, de 81 e 100%, respectivamente.

4.4. Processamento de dados: identificação de variantes de hemoglobina e criação de uma biblioteca FASTA

O Skyline (PINO; SEARLE; BOLLINGER; NUNN *et al.*, 2020) foi usado neste trabalho não apenas para permitir a deconvolução de dados, mas também em várias etapas de desenvolvimento do método. Construímos um banco de dados com as sequências FASTAs de variantes com 420 entradas correspondentes a todas as variantes naturais descritas no UniProt (CONSORTIUM, 2021) para as cadeias alfa e beta (acessos UniProt P69905 e P68871). Construímos uma biblioteca espectral experimental a partir de dados de DDA de sangue total (Figura 10). A biblioteca espectral obtida por meio do processamento dos dados obtidos DDA pelo programa TPP/comet, permitiu a seleção e curadoria manual dos espectros.

A fim de aumentar as coberturas de sequência para as cadeias alfa e beta, uma clivagem perdida foi permitida para alguns peptídeos, resultando em 100% de cobertura da sequência da cadeia alfa e 96% para a cadeia beta. Para os peptídeos previstos para variantes, Prosit (GESSULAT; SCHMIDT; ZOLG; SAMARAS *et al.*, 2019) foi usado para construir uma biblioteca espectral e uma calculadora de tempo de retenção. Habilitando a calibração Prosit com NCE em 30%, verificamos uma boa concordância entre os espectros de dissociação experimental e predito (Figura 11), indicando que as bibliotecas espectrais previstas podem ser usadas para confirmar a identificação do peptídeo.

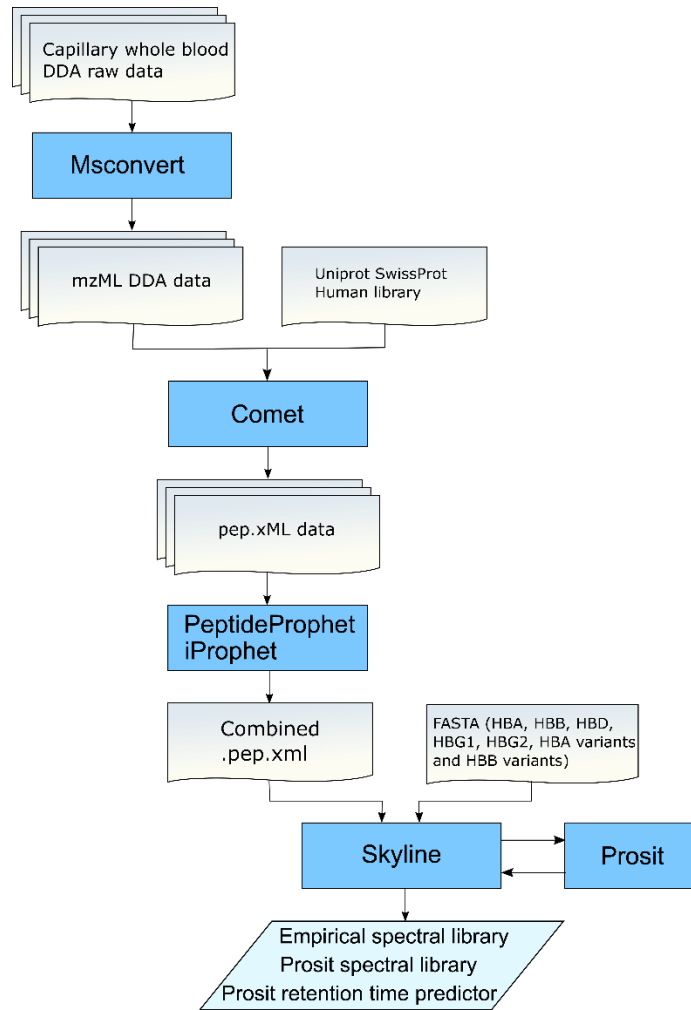


Figura 10: Fluxo de trabalho para a identificação baseada na aquisição independente de dados de variantes de hemoglobina.

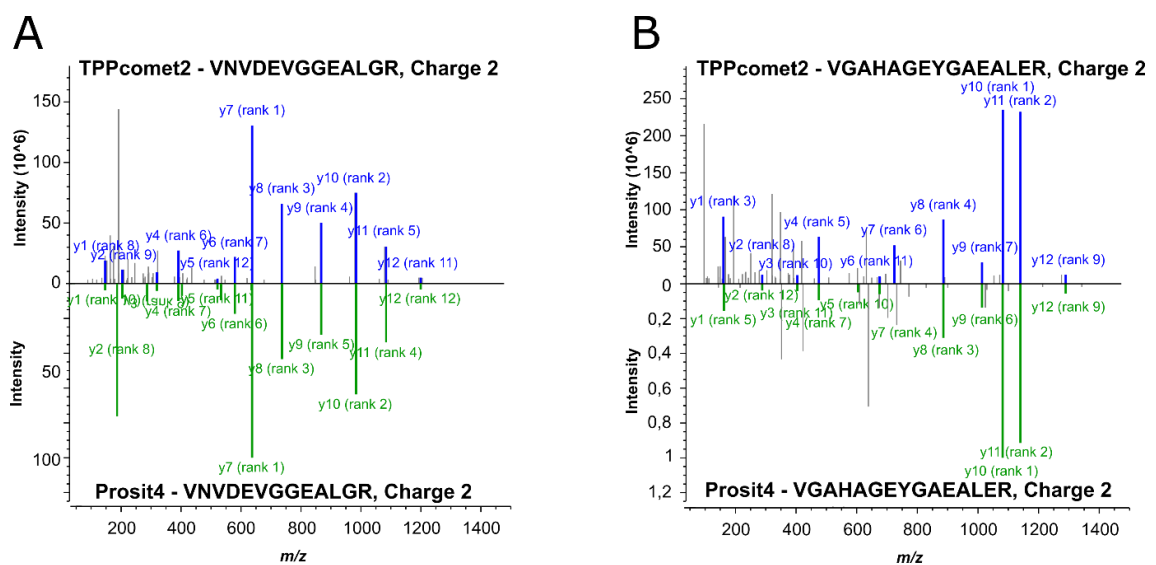


Figura 11. Comparação entre espectros MS2 experimental (TPPcomet2) e predito (Prosit4). (A) HBB (VNVDEVGGEALGR, dupla carga, NCE = 30); (B) HBA (VGAHAGEYGAEALER, dupla carga, NCE = 30). HBB: cadeia beta de hemoglobina. HBA: cadeia alfa de hemoglobina.

Como as hemoglobinopatias incluem mudanças qualitativas e quantitativas nas cadeias de globina, um único fluxo de trabalho para verificar uma variação na sequência da globina ou um padrão de síntese de globina anormal como aqueles observados nas talassemias, é difícil de estabelecer. No entanto, após a análise de 36 espécimes de hemoglobinopatia, propomos um roteiro de revisão dos dados importados e deconvoluídos no Skyline (Figura 12). O Skyline fornece uma interface conveniente para inspecionar parâmetros de peptídeos em muitas amostras.

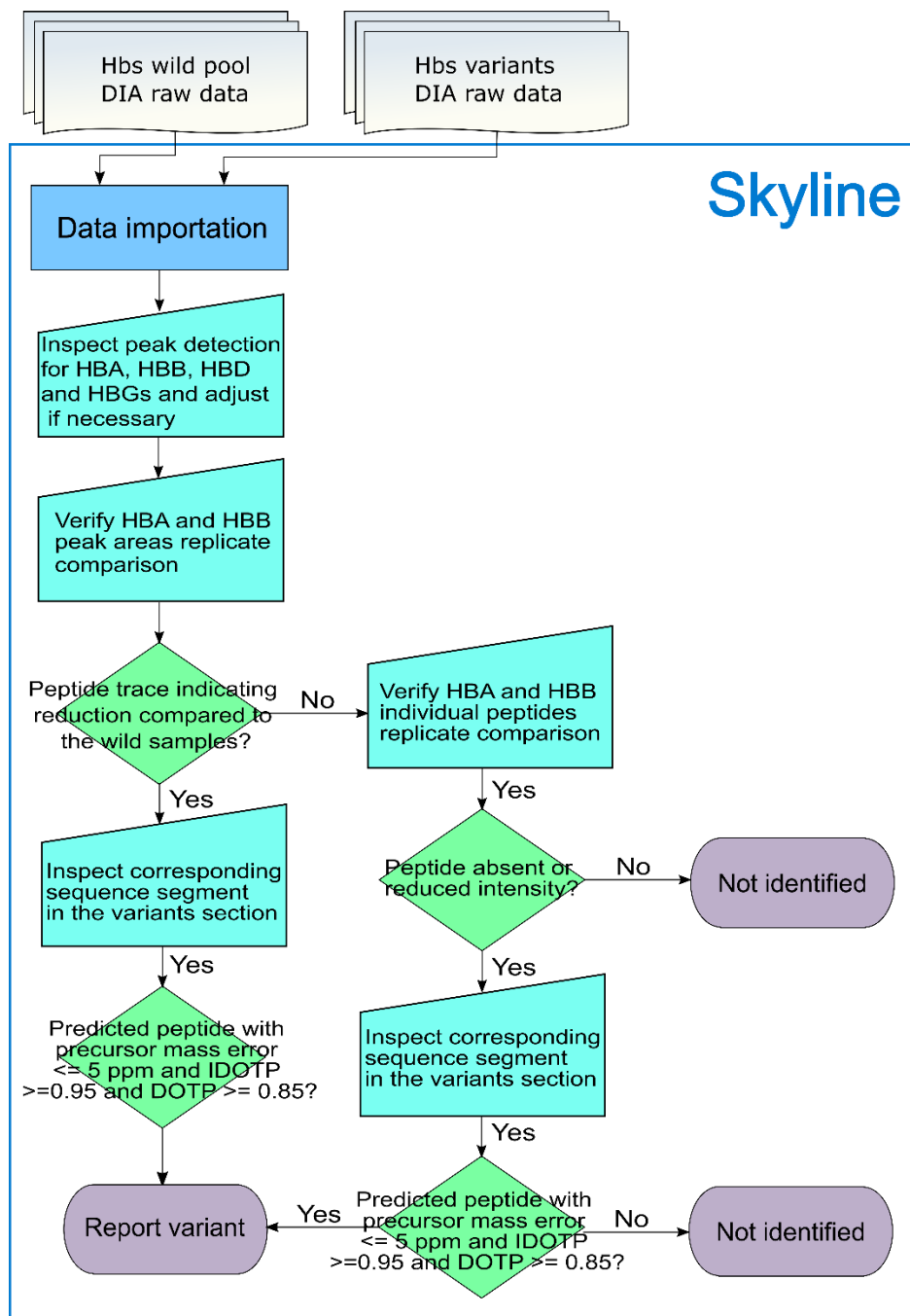


Figura 12. Fluxo de trabalho para interpretação dos dados obtidos por aquisição independente de dados na análise de variantes usando o Skyline.

A Figura 13 ilustra o processo de identificação da variante Hasharon (UniProt HBAVAR002765). Examinando a comparação das réplicas das áreas dos picos, é possível observar uma diminuição na área do pico para o peptídeo TYFPHFDSLHGSAQVK. A verificação do gráfico de comparação de replicação das áreas de pico do peptídeo individual confirmou esta descoberta, uma vez que a intensidade do peptídeo é reduzida em comparação com as amostras de *pool*

selvagem e outras variantes analisadas no mesmo lote. Analisando os peptídeos de variantes esperadas da cadeia alfa de Hb, na sequência de posição 40 a 59, observamos o peptídeo de íons precursores com carga dupla e tripla correspondente a TYFPHFHLSHGSAQVK. O peptídeo variante é ainda confirmado por *dot products* de isótopos de íons precursores (0,99 e 0,98, respectivamente, para íons precursores previstos de carga dupla e tripla), e de íons produtos (0,97 e 0,91) pela biblioteca experimental predita pela ferramenta *Prosit*, com erro de massa inferior a 2 ppm, além do tempo de retenção próximo ao previsto calculado pelo *Prosit*. O peptídeo detectado, TYFPHFHLSHGSAQVK, corresponde à substituição de ácido aspártico (D) por histidina (H) na posição 48, que indica a variante Hasharon (CHARACHE; MONDZAC; GESSNER, 1969).

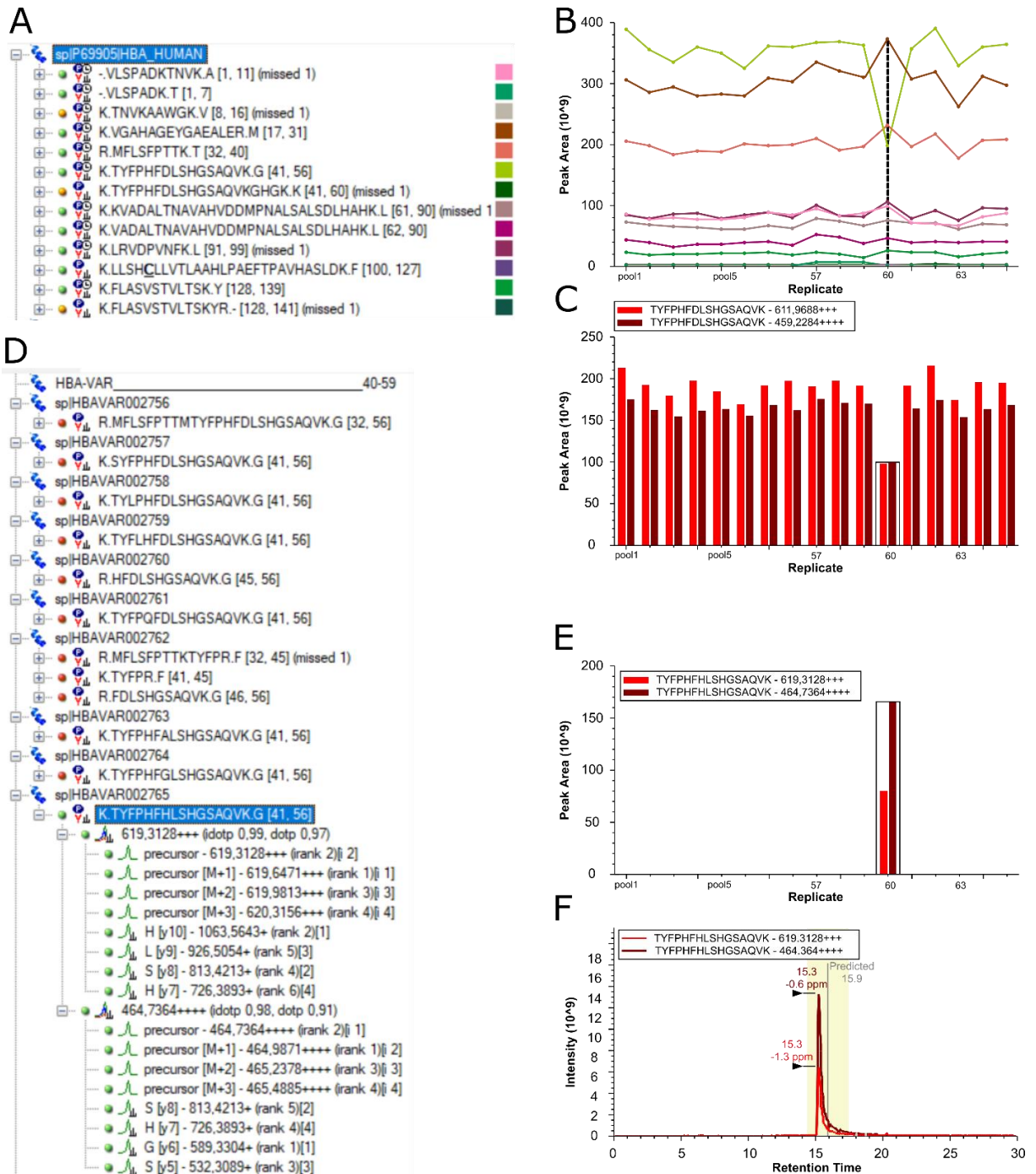


Figura 13. Identificação da variante Hasharon (UniProt HBAVAR002765). (A) Peptídeos trípticos da subunidade alfa da hemoglobina (HBA_HUMAN); (B) Abundância relativa dos peptídeos (em área) em diferentes amostras mostrando a diminuição relativa na área do pico para o peptídeo TYFPFHDLSHGSAQVK na amostra 60; (C) As áreas dos picos dos peptídeo individuais no Skyline representados no gráfico de comparação, que descreve a diminuição relativa na área de pico para o peptídeo TYFPFHDLSHGSAQVK na amostra 60; (D) Variantes da subunidade alfa da hemoglobina (detalhes de variantes na posição de sequência de 40 a 59); (E) As áreas de pico de peptídeo individual no Skyline replicam gráfico de comparação representando a detecção do peptídeo de íons precursores com carga dupla e tripla correspondente a TYFPFHLSHGSAQVK; (F) Cromatogramas extraídos de aquisição independente de dados para o precursor de carga dupla e tripla previsto e íons de produto correspondentes a TYFPFHLSHGSAQVK.

Outro exemplo é ilustrado na Figura 14. Analisando o gráfico da abundância dos diferentes peptídeos em termos de área de diferentes amostras (Figura 14B) é possível observar uma diminuição relativa na área de pico para o peptídeo EFTPPVQAAYQK na amostra 51. Procurando os peptídeos variantes esperados para as variantes beta da subunidade de hemoglobina na sequência de posição 120 a 131, observamos a detecção do precursor com carga dupla e íons de produto correspondentes a QFTPPVQAAYQK. O peptídeo variante é ainda confirmado por *dot products* de isótopos de íons precursores (0,99), e de íons produtos (0,98) pela ferramenta de *Prosit-predicted*, erro de massa inferior a 2 ppm, além do tempo de retenção próximo ao previsto calculado pelo Prosit. O peptídeo detectado, QFTPPVQAAYQK indicou a variante HbD E122Q (também conhecida como D-Los Angeles, D-Punjab, D-Portugal, D-Chicago ou D-Oak Ridge) (BENZER; INGRAM; LEHMANN, 1958).

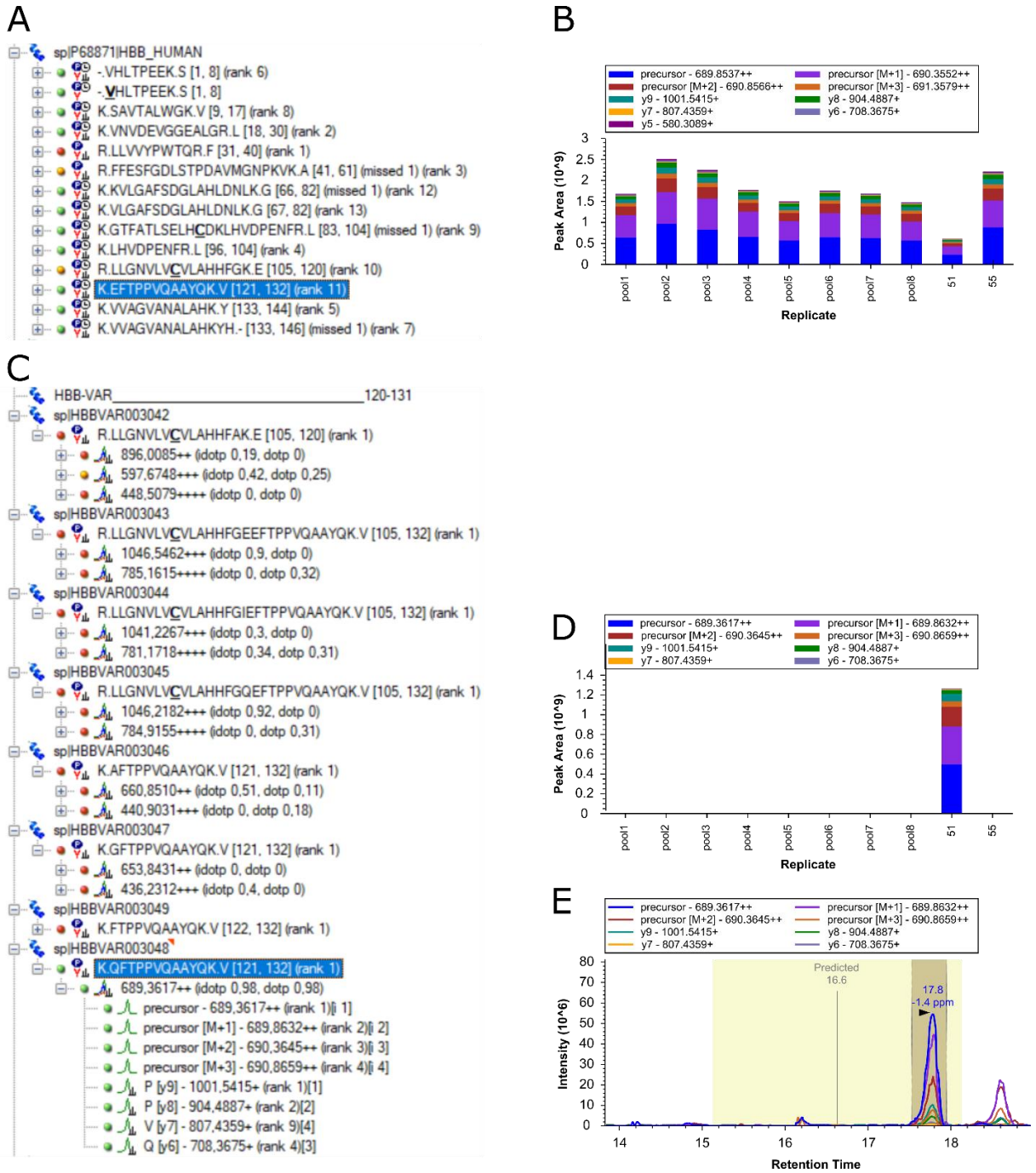


Figura 14. Identificação da variante D-Los Angeles / D-Punjab / D-Portugal / D-Chicago / D-Oak Ridge (UniProt HBBVAR_003048). (A) Peptídeos trípticos da subunidade beta da hemoglobina (HBB_HUMAN); (B) As áreas dos picos dos peptídeo individuais no Skyline representados no gráfico de comparação, que descreve a diminuição relativa na área de pico para o peptídeo EFTPPVQAAYQK na amostra 51; (C) Variantes esperados da cadeia beta de hemoglobina (detalhes da variante na sequência de posição 120 a 131); (D) As áreas de pico de peptídeo individuais de Skyline replicam gráfico de comparação representando a detecção do precursor com carga dupla e íons de produto correspondentes a QFTPPVQAAYQK; (E) Cromatogramas extraídos de aquisição independente de dados para o precursor de carga dupla e tripla previsto e íons de produto correspondentes a QFTPPVQAAYQK.

Trinta e seis amostras de hemoglobinopatias previamente analisadas por eletroforese de zona capilar seguida por cromatografia líquida de troca catiônica (CZE /CX-HPLC) foram incluídas neste estudo e vinte e três concordaram entre os dois métodos (Tabela 1). A abordagem proteômica baseada em DIA (Figuras 10 e 12) caracterizou espécimes de amostras não identificadas por CZE / CX-HPLC, como as variantes raras Woodville (Figura 15) e Okayama (Figura 16).

Tabela 1. Comparação entre a identificação de variantes de hemoglobina por eletroforese de zona capilar seguida por cromatografia líquida de troca catiônica (CZE/CX-HPLC) e cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas sequencial (LC-MS/MS) baseada em DIA.

	CZE/CEX-HPLC	Número de amostras	LC-MS/MS
Concordantes	HBS	7	Confirmado (HBBVAR002863)
	HBC	6	Confirmado (HBBVAR002864)
	HBD (D-Los Angeles)	4	Confirmado (HBBVAR003048)
	HBS homozigoto	4	Confirmado (HBBVAR002863)
	Hasharon/Sinai	1	Confirmado (HBAVAR002765)
	Hope	1	Confirmado (HBBVAR003075)
LC-MS/MS	Não identificadas	2	HBS (HBBVAR002863)
Novas	Não identificadas	1	Okayama (HBBVAR002858)
identificações	Não identificadas	1	Woodville (HBAVAR002727)
Discordantes	Hasharon/Sinai	1	Hasharon homozigoto (HBAVAR002765)
	HBD (D-Los Angeles) homozigoto / β -Talassemia	1	Discordante (HBD homozigoto)
	HBS / β -Talassemia	1	Discordante (HBS homozigoto)
	HBS / β -Talassemia	1	Discordante (HBS homozigoto)
	HBD (D-Los Angeles)	1	Discordante (HBD peptídeo não detectado, HBB VHLTPEEK elevado)
	Camden	1	Discordante (peptídeo Camden não detectado)
	Lepore	1	Não identificado (HBA VLSPADK elevado)
Não identificado	Não identificado	1	Não identificado (cadeia beta elevada)
	Não identificado	1	Não identificado (HBA VLSPADK e HBB VLSPADKTNVK elevados)
	Não identificado	1	Não identificado (HBA VLSPADK elevado)

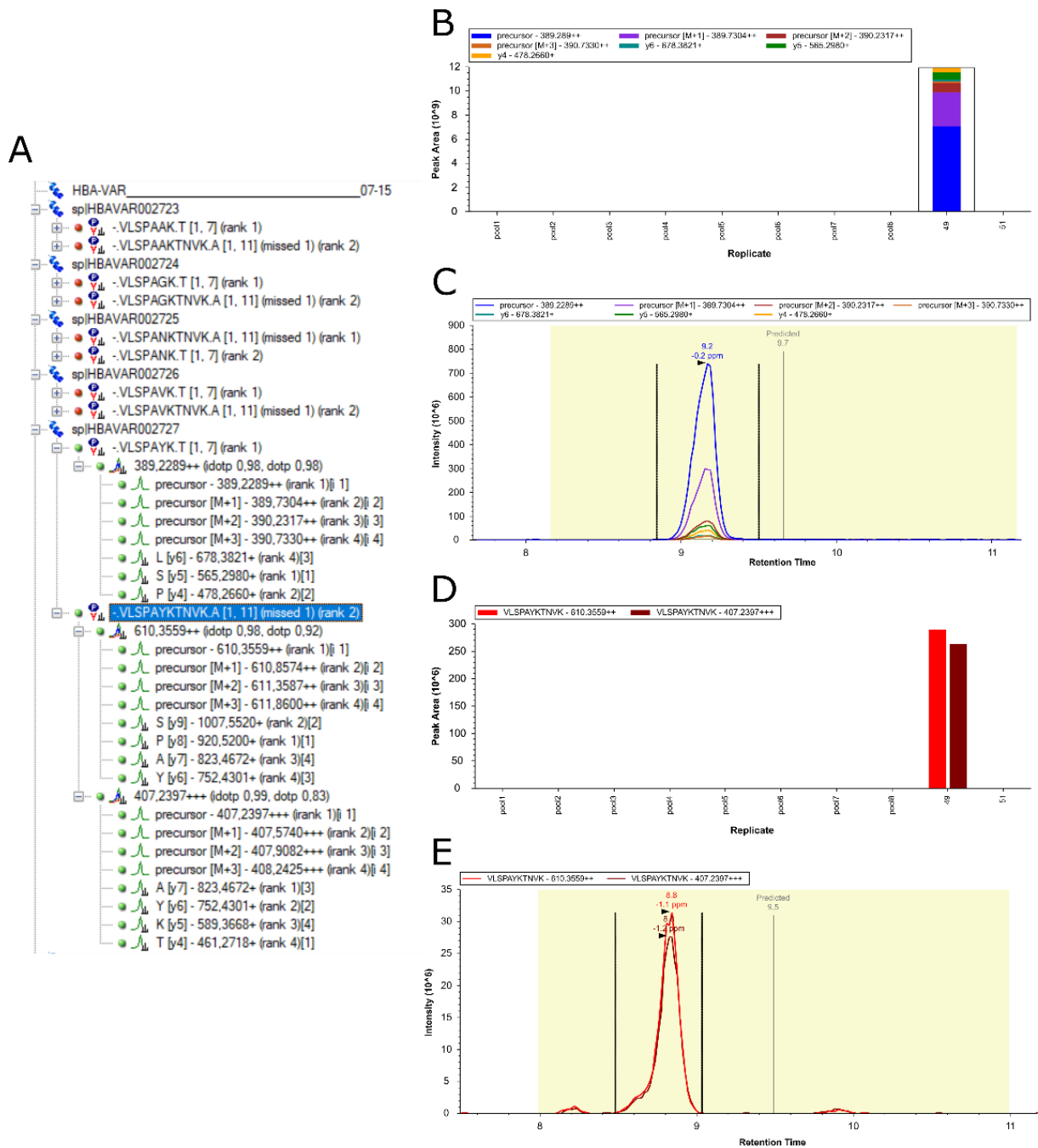


Figura 15. Identificação da variante Woodville (UniProt HBAVAR002727). (A) Variantes da subunidade alfa da hemoglobina (detalhes das variantes na posição da sequência de 1 a 7); (B) As áreas de pico do peptídeo individual Skyline replicam o gráfico de comparação que descreve a detecção do peptídeo de íons precursores com carga dupla correspondente a VLSPAYK na amostra 49; (C) Cromatogramas extraídos de aquisição independente de dados para o precursor de carga dupla previsto e íons de produto correspondentes a VLSPAYK; (D) As áreas de pico do peptídeo individual Skyline replicam o gráfico de comparação que descreve a detecção do peptídeo de íons precursores com carga dupla e tripla correspondente ao produto de clivagem perdida VLSPAYKTNVK; (E) Cromatogramas extraídos de aquisição independente de dados para o precursor com carga dupla e tripla prevista e íons de produto correspondentes ao produto VLSPAYKTNVK de clivagem perdida.

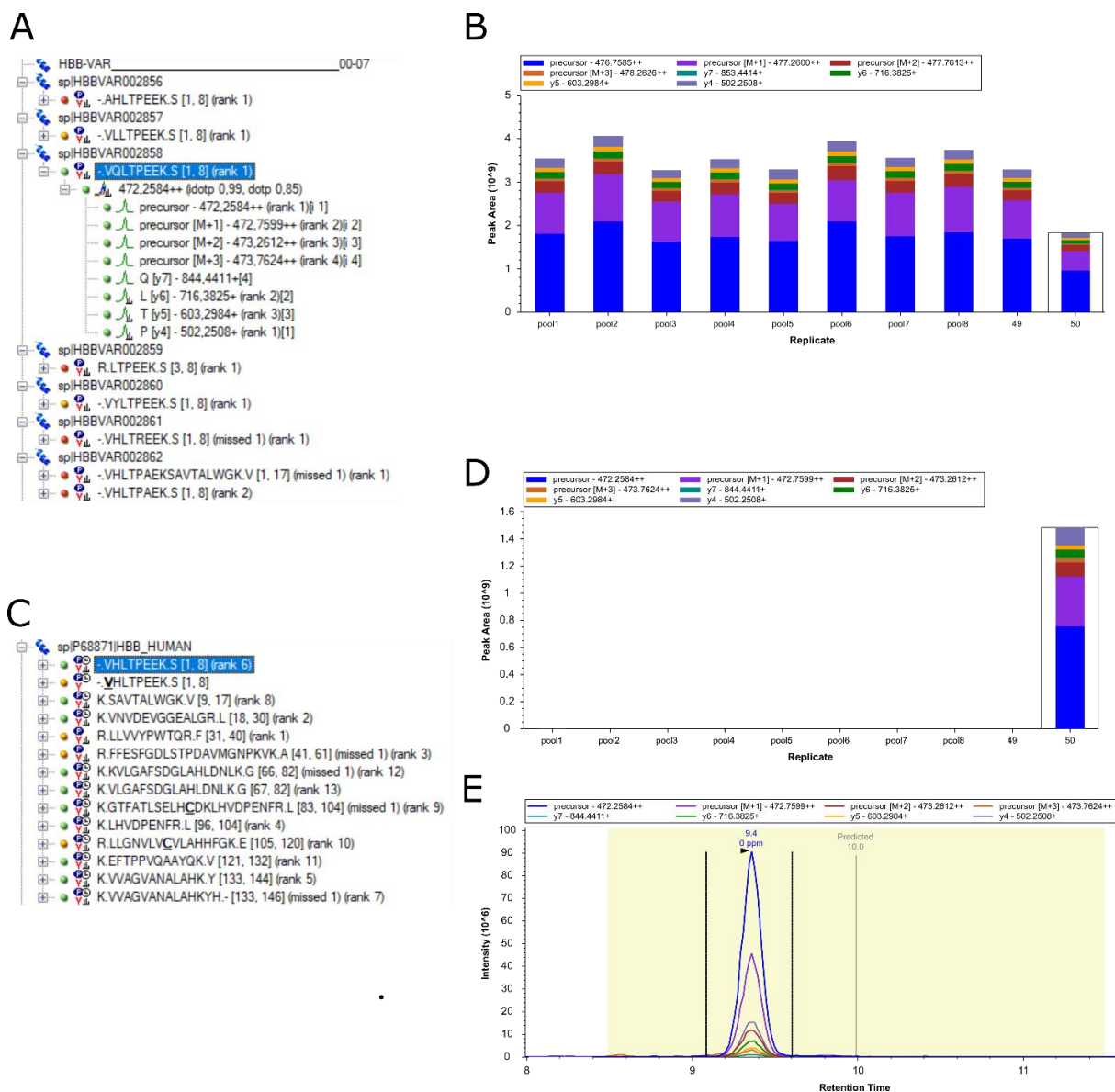


Figura 16: Identificação da variante Okayama (HBBVAR002858). (A) Variantes beta da subunidade da hemoglobina (detalhes das variantes na posição da sequência de 1 a 8); (B) As áreas dos picos dos peptídeo individuais no Skyline representados no gráfico de comparação, que descreve a diminuição relativa na área de pico para o peptídeo VHLTPEEK; (C) Peptídeos trípticos da subunidade beta da hemoglobina (HBB_HUMAN) (detalhes na posição da sequência de 1 a 8); (D) As áreas de pico do peptídeo individual da Skyline replicam o gráfico de comparação que descreve a detecção do precursor com carga dupla e íons de produto correspondentes a VQLTPEEK; (E) Cromatogramas extraídos de aquisições independente de dados para o precursor de carga dupla previsto e íons de produto correspondentes a VQLTPEEK.

Das e colaboradores (DAS; MITRA; MATHEW; ROSS *et al.*, 2013), desenvolveram uma abordagem baseada em MSE, que é uma aquisição independente de dados, mas em MS1, uma vez que não há seleção de janelas precursoras, portanto, menos seletiva e dependente da correspondência por um processamento de software proprietário (ProteinLynx). Além disso, este método é embasado em uma análise por nanocromatografia de 60 minutos, com preparação

manual da amostra, demandando separação e lavagem das células sanguíneas. Nosso método foi baseado em uma aquisição DIA empregando uma separação por microcromatografia de 30 minutos, mais robusta e com preparação de amostra totalmente automatizada de sangue total seco imobilizado em VAMS. Um ponto forte da abordagem proposta é a combinação de vários qualificadores para curar e confirmar uma variante de sequência, como a inspeção nas sequências selvagens e a validação da detecção de peptídeos previstos por *dot products* e consenso com os tempos de retenção previstos.

Os distúrbios hereditários da Hb podem ser classificados em dois grupos: (1) talassemia, que é causada pela síntese prejudicada de globina, e (2) hemoglobinopatias, causada por distúrbios estruturais. O diagnóstico é um processo complexo baseado na combinação de informações clínicas anteriores com uma infinidade de testes laboratoriais diferentes. A análise de rotina inclui parâmetros hematológicos clássicos como hemograma completo, níveis de hemoglobina e morfologia dos glóbulos vermelhos são os indicadores iniciais de distúrbios relacionados à Hb (KUTLAR, 2007). CEX-HPLC e CZE são as técnicas mais utilizadas para identificação de hemoglobinopatias e apresentam vantagens, como a preparação automática de amostras a partir do tubo de ensaio do paciente. Essas técnicas analisam a estrutura tetramérica nativa da Hb e podem separar a forma de Hb predominante esperada (HbA, $\alpha\beta_2$), que responde por aproximadamente 98% em adultos, de formas minoritárias, como HbA2 ($\alpha_2\delta_2$) e de HbF ($\alpha_2\gamma_2$). Picos cromatográficos ou eletroforéticos adicionais podem indicar variantes de hemoglobina e a quantificação dos tetrâmeros é importante para o diagnóstico de talassemia. A detecção de Hb é obtida por detecção espectrofotométrica em 415 nm e identificação com base nos tempos de retenção previstos em regiões definidas no cromatograma ou eletroferograma. Portanto, essas técnicas são convenientes para a rotina clínica, mas não necessariamente inequívocas, uma vez que carecem de seletividade.

A análise molecular dos genes da globina (HBA1, HBA2 e HBB) pode contribuir para o diagnóstico da doença da hemoglobina. No entanto, a alta homologia de HBA1 e HBA2, o grande número de variações e a heterogeneidade de tipo e localização podem ser um desafio (FARASHI; HARTEVELD, 2018; THEIN, 2018). Em uma série de 208 pacientes consecutivos com evidência laboratorial de beta-talassemia que

foram analisados no Grupo Fleury, 6,7% não tiveram variação molecular detectada pelo sequenciamento Sanger convencional (LAVELLE, 2019). Os números podem variar de acordo com o estudo, porém detectar a causa da hemoglobinopatia ainda é um desafio. Portanto, uma abordagem alternativa que possa contribuir para a investigação é de grande valor.

Diferentes abordagens baseadas em espectrometria de massas foram propostas para identificar variantes de hemoglobina (ZANELLA-CLEON; JOLY; BECCHI; FRANCIANA, 2009). A análise direta de cadeias polipeptídicas de globina intactas por proteômica usando estratégia *top down* permite a preparação de amostra simples. No entanto, a interpretação espectral de MS2 é desafiadora e mesmo se tratando de variantes comuns de Hb, como HbC e HbD, são difíceis de identificar quando a Hb selvagem está presente (RAI; LANDIN; ALVELIUS; GRIFFITHS, 2002). Métodos proteômicos direcionados também foram descritos usando abordagens *bottom up* (HELMICH; VAN DONGEN; KUIJPER; SCHARNHORST et al., 2016) e *top down* (LASSOUT; HARTMER; JABS; CLERICI et al., 2019). A proteômica direcionada é muito sensível e seletiva, mas limitada a alguns alvos moleculares selecionados.

Como inúmeras variantes da Hb foram descritas (GIARDINE; BORG; VIENNAS; PAVLIDIS et al., 2014), a proteômica baseada em DIA parece ser uma alternativa promissora para complementar o diagnóstico de hemoglobinopatia. Por outro lado, um dos maiores desafios na implementação de métodos baseados em DIA é a deconvolução computacional dos espectros fragmentados multiplexados adquiridos (ZHANG; GE; RUAN; CAI et al., 2020).

4.5. Processamento de dados: quantificação de HbA1c com abordagem de aquisição independente de dados e amostragem por VAMS

A digestão das cadeias de beta hemoglobina com tripsina resultou na geração de octapeptídeos N-terminais: VHLTPEEK e glyc-VHLTPEEK (Figura 17). O N-terminal não glicado (VHLTPEEK) foi definido como padrão substituto no Skyline para estabelecer a glicação com base em uma regressão linear obtida a partir de uma curva de calibração. O método de referência IFCC (JEPPSSON; KOBOLD; BARR; FINKE et al., 2002) é baseado na digestão da endoproteínase Glu-C, que resulta em um hexapeptídeo e a detecção por espectrometria de massas é baseada no íon precursor

utilizando modo SIM em equipamentos de resolução unitária. Neste estudo, avaliamos a detecção de massa de alta resolução em MS1 combinando sinais de 4 isotopômeros e em MS2 combinando 4 íons produto. A detecção de MS2 forneceu melhores coeficientes de correlação linear.

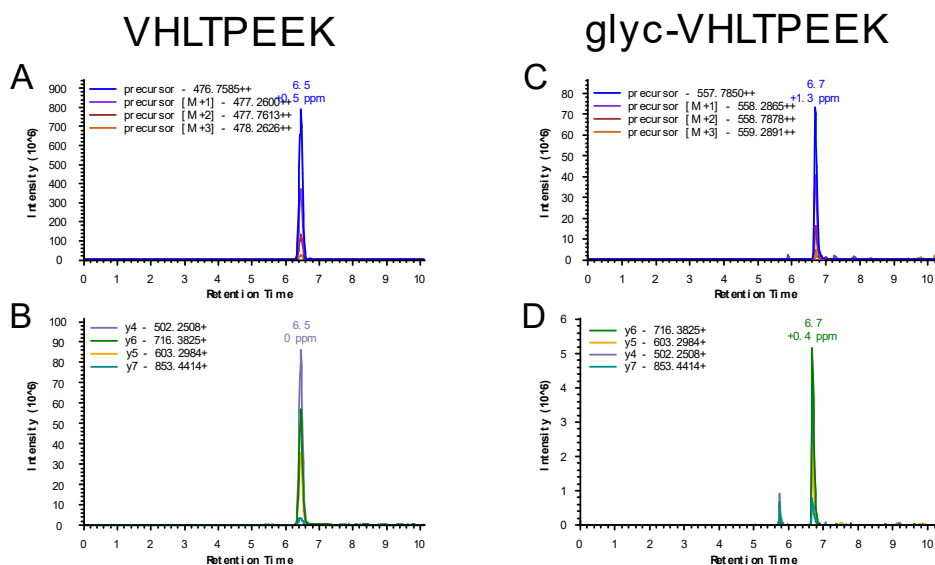


Figura 17. Cromatogramas extraídos de aquisição independente de dados correspondentes às coordenadas de relação massa/carga dos peptídeos tripticos N-terminais da cadeia beta hemoglobina. (A) íons precursores do peptídeo não glicado; (B) íons produtos do peptídeo não glicado; (C) íons precursores do peptídeo glicado; (D) íons produtos do peptídeo glicado.

4.5.1. Validação do método de quantificação por DIA

Cinquenta amostras previamente avaliadas por analisador de HPLC automatizado D-100 (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA) certificado pelo NGSP e com concentrações de HbA1c uniformemente distribuídas ao longo do intervalo clínico de HbA1c foram usadas para avaliar a acurácia do método. Para estabelecer a concentração da curva de calibração de 10 pontos, que foi produzida a partir da diluição de um *pool* de pacientes com alta concentração de HbA1c com um *pool* de baixa concentração, uma curva a partir de 24 amostras foi utilizada como referência. Essa curva ajustada pela referência NGSP foi então utilizada para quantificar as demais amostras incluídas no estudo. Pela regressão de Deming os valores de *slope* e intercepto foram de 0,948 (0,869 a 1,027 IC95%) e 0,3 (-0,34 a 0,94 IC95%), respectivamente, mostrando que as comparações dos métodos foram

estatisticamente idênticas dentro de um intervalo de confiança de 95%. O viés médio obtido foi de -1,22% (Figura 18).

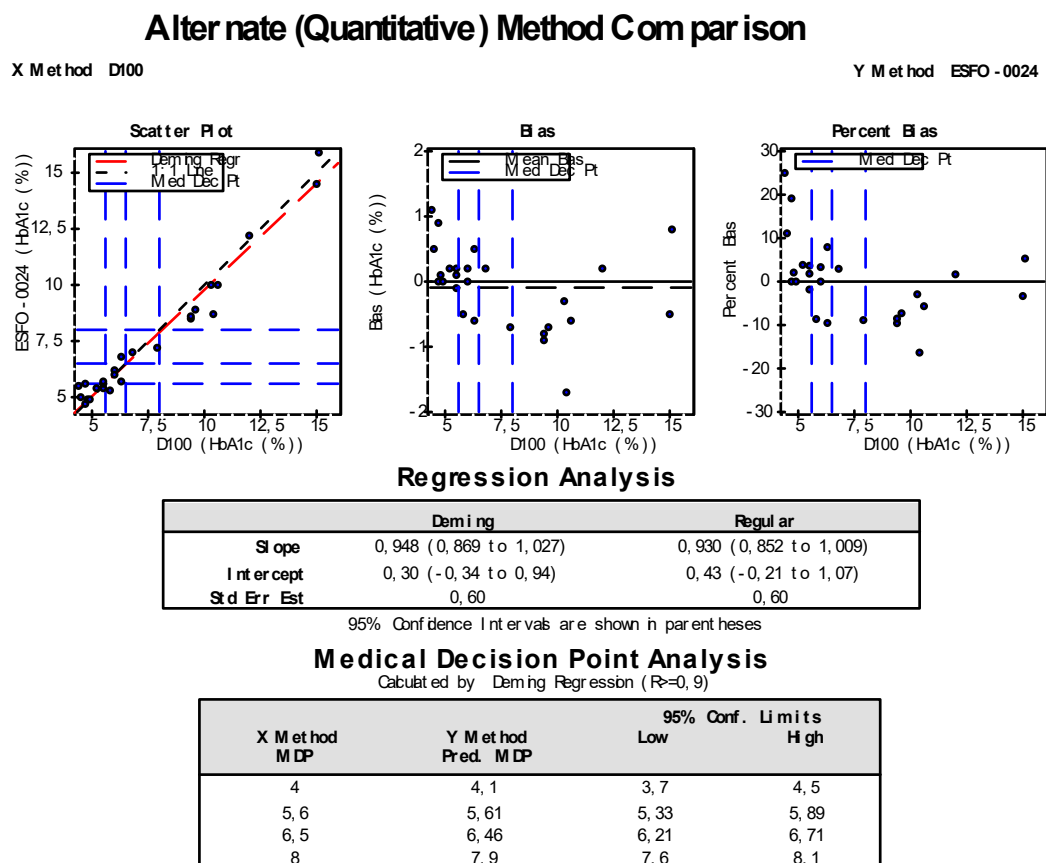


Figura 18. Avaliação da acurácia do método desenvolvido para a quantificação da hemoglobina glicada HbA1c empregando o software EP Evaluator.

Para a avaliação da imprecisão da quantificação de HbA1c, avaliamos três níveis de HbA1c com concentrações médias de 5,0, 6,9 e 11,0% de HbA1c (30,9, 52,0 e 93,3 mmol/mol). Os coeficientes de variação obtidos variaram de 6,1 a 12,8% (Tabela 2, Anexo C). Como os ensaios de HbA1c usados para diagnóstico, devem atingir uma imprecisão menor que 3% (SACKS; ARNOLD; BAKRIS; BRUNS *et al.*, 2011), este método não é aplicável para a rotina clínica de dosagem de HbA1c. O método de referência IFCC (JEPPSSON; KOBOLD; BARR; FINKE *et al.*, 2002), que é projetado para atender a CVs muito baixos, é baseado em uma estratégia semelhante, isto é, a determinação de peptídeos de cadeia β N-terminal após digestão enzimática. Enquanto o método de referência IFCC é baseado na digestão com endoproteinase Glu-C que resulta em um hexapeptídeo, aqui usamos tripsina que

produz octapeptídeo. No entanto, o processamento de amostra do método IFCC requer o isolamento de eritrócitos, resultando em uma matriz muito mais simples e purificada do que o sangue total.

Tabela 2. Resultados das imprecisões obtidas do método desenvolvido de quantificação da hemoglobina glicada HbA1c em três concentrações diferentes.

Nível	Concentração média (% de HbA1c)	CV (%)
PREC1	4,98	6,6
PREC2	6,91	6,1
PREC3	10,96	12,8

O teste de linearidade utilizou 10 concentrações diferentes de HbA1c no intervalo de 4,78 a 15,99%. Os dados analisados em triplicata por 4 dias consecutivos foram avaliados no software EP e apresentaram linearidade até a concentração superior testada (15,99%).

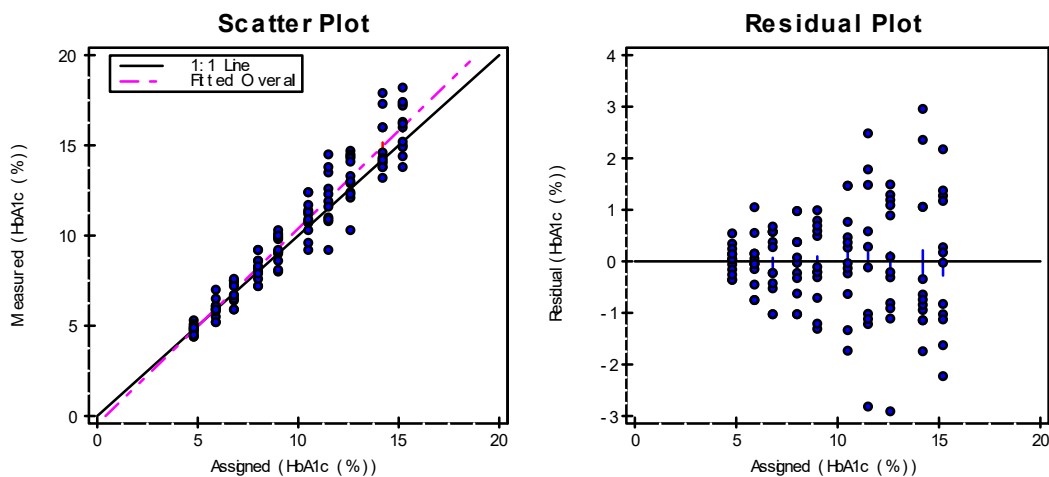


Figura 19. Avaliação da linearidade da metodologia por de gráficos de dispersão dos valores.

	Assigned	Pct	N	Est	Mean	Residual	Linearity
LI NE1	4,8	--	12	4,76	4,78	0,02	Pass
LI NE2	5,9	--	12	5,95	5,92	-0,03	Pass
LI NE3	6,8	--	12	6,93	6,89	-0,03	Pass
LI NE4	8	--	12	8,23	8,18	-0,04	Pass
LI NE5	9	--	12	9,31	9,27	-0,04	Pass
LI NE6	10,5	--	12	10,93	10,99	0,06	Pass
LI NE7	11,5	--	11	12,02	12,01	-0,01	Pass
LI NE8	12,6	--	12	13,21	13,19	-0,02	Pass
LI NE9	14,2	--	12	14,94	14,93	-0,01	Pass
LI NE10	15,2	--	12	16,03	15,99	-0,04	Pass

See User's Specifications for Pass/Fail Criteria.

Linearity Summary

Overall	--
Slope	1,084
Intercept	-0,44
Obs Err	-- (conc) or 0,5%
N	10
LINEAR within SEa of	-- (conc) or 1,5%

User's Specifications

Allowable Total Error	-- (conc) or 3,0%
Systematic Error Budget	50%
Allowable Systematic Error	-- (conc) or 1,5%

Supporting Data

Analyst	DAL		
Date	11 nov 2021		
Value Mode	Pre-Assigned		
Units	HbA1c (%)		
Controls	P&D 2021a exp 31	dez 2023	
Reagent	P&D 2021a exp 31	dez 2023	
Calibrators	P&D 2021a exp 31	dez 2023	
Comment			

Experimental Results

LI NE1	4,4	4,4	4,7	4,8	5,3	5,1	4,8
LI NE2	4,6	4,9	5	4,5	4,9		
LI NE3	5,2	5,5	5,2	6	7	5,9	6,1
LI NE4	5,8	5,9	6,5	6,1	5,9		
LI NE5	5,9	6,4	5,9	7,5	7,5	7,5	7,3
LI NE6	6,7	7,6	7,2	6,5	6,7		
LI NE7	7,6	7,2	7,2	8,2	9,2	8	8,2
LI NE8	7,9	9,2	8,6	8,6	8,3		
LI NE9	8	8,1	9	9,8	9,9	9,1	10,1
LI NE10	9,1	10,3	9,2	8,6	10		
	9,6	9,2	10,7	11,2	12,4	10,8	11,4
	10,3	12,4	11,3	10,9	11,7		
LI NE7	11	9,2	10,8	11,9	X 5,4	10,9	14,5
	13,5	13,8	12,6	12,3	11,6		
LI NE8	10,3	12,4	12,1	12,9	12,3	14,7	14,5
	14,4	14,3	14,1	13,3	13		
LI NE9	14	13,8	13,2	14,6	14,3	14,1	17,9
	17,3	16	16	13,8	14,2		
LI NE10	14,4	15	14,9	16	16,3	17,3	18,2
	17,2	17,4	16,2	13,8	15,2		

X: Excluded from calculations
 T: Exceeds Allowed Total Error

Evaluation of Results

The Linearity of HbA1c was analyzed on ESFO -0024 over a measured range of 4,78 to 15,99 HbA1c (%). Accuracy and Reportable Range were not evaluated in this experiment. Allowable systematic error (SEa) was -- (conc) or 1,5%. The results are LINEAR.

Figura 20. Avaliação da linearidade da metodologia.

A avaliação do limite de quantificação foi realizada analisando 5 amostras com baixas concentrações ao longo de 10 dias. O LOQ estimado é calculado a partir da menor concentração obtida que apresentou um CV maior que 20%. No intervalo testado, os CVs calculados para todos os níveis testados foram menores que 20% e, portanto, a menor concentração testada, 4,2%, foi estabelecida como o LOQ.

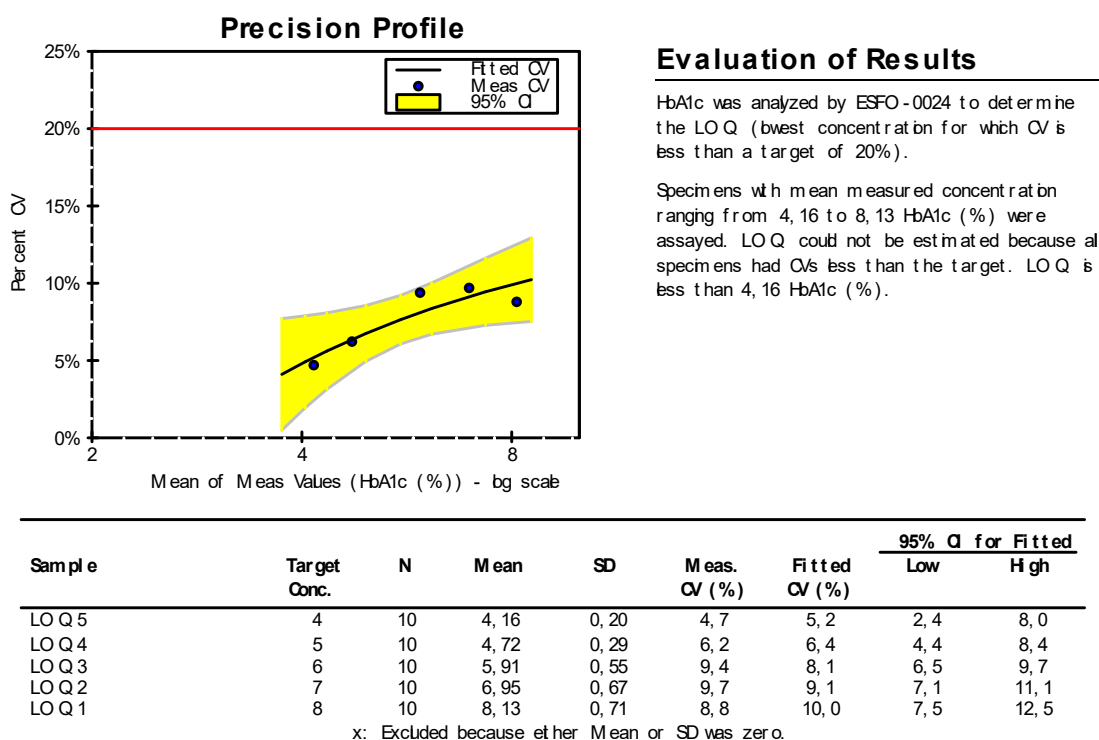


Figura 21. Avaliação do limite de quantificação do método desenvolvido para a quantificação da hemoglobina glicada HbA1c empregando o software EP Evaluator.

4.5.2. Teste de estabilidade da HbA1c em amostragem VAMS entre coleta venosa e capilar

O estudo de estabilidade utilizou sangue total venoso e capilar em dispositivos VAMS armazenados em temperatura ambiente por 0, 1, 3 e 7 dias. Sendo o tempo 0, dosado pelo método de referência da rotina através do analisador de HPLC automatizado D-100 (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA). Todas as condições foram testadas em triplicata na mesma execução e os testes *t* foram realizados entre cada

condição e os controles armazenados em sacos plásticos selados com dissecante a - 80 °C.

Tabela 3. Teste de estabilidade da hemoglobina glicada HbA1c em microamostragem absorviva volumétrica (VAMS) de sangue capilar, por 1, 3 e 10 dias.

Amostra	Réplica	Resultado	Média
Sangue capilar dia 1	1	5,47	5,50
	2	5,43	
	3	5,60	
Sangue capilar dia 3	1	5,23	5,31
	2	5,30	
	3	5,40	
Sangue capilar dia 10	1	6,03	6,20
	2	6,30	
	3	6,27	
Valor de p (1 dia x 3 dias)		0,02745	
Valor de p (1 dia x 10 dias)		0,01639	

Tabela 4. Teste de estabilidade da hemoglobina glicada HbA1c em microamostragem absorviva volumétrica (VAMS) de sangue venoso, por 1, 3 e 10 dias.

Amostra	Réplica	Resultado	Média
Sangue venoso dia 1	1	5,47	5,50
	2	5,43	
	3	5,60	
Sangue venoso dia 3	1	6,17	6,12
	2	6,03	
	3	6,17	
Sangue venoso dia 10	1	6,93	6,85
	2	6,73	
	3	6,90	
Valor de p (1 dia x 3 dias)		0,00395	
Valor de p (1 dia x 10 dias)		0,00155	

Tabela 5. Teste de estabilidade da hemoglobina glicada HbA1c em microamostragem absorviva volumétrica (VAMS) de sangue capilar e venoso, comparando condição de coleta de acordo com os dias 1, 3 e 10 dias.

Amostra	Réplica	Resultado	Média
Sangue venoso dia 1	1	5,47	5,50
	2	5,43	
	3	5,60	
Sangue capilar dia 1	1	5,23	5,31
	2	5,30	
	3	5,40	
Valor de p		0,02745	
Sangue venoso dia 3	1	6,17	6,12
	2	6,03	
	3	6,17	
Sangue capilar dia 3	1	5,60	5,71
	2	5,83	
	3	5,70	
Valor de p		0,06462	
Sangue venoso dia 10	1	6,93	6,85
	2	6,73	
	3	6,90	
Sangue capilar dia 10	1	6,03	6,20
	2	6,30	
	3	6,27	
Valor de p		0,04080	

Os valores de p em todas as situações testadas no ensaio de estabilidade concluíram haver diferença significativa, não sendo uma opção viável de armazenamento amostras VAMS acima de 3 dias em temperatura ambiente. Uma fonte de variabilidade pode estar associada à estabilidade da HbA1c nesses dispositivos. Analisando os VAMS armazenados em temperatura ambiente por 3 e 10 dias comparados aos mantidos sob refrigeração desde o dia da coleta, detectamos

aumento significativo da glicação tanto para o sangue capilar quanto para o venoso (Tabela 5). Apesar de alguns analitos apresentarem estabilidade em VAMS após 2 meses em temperatura ambiente (MANDRIOLI; MERCOLINI; PROTTI, 2020), nosso trabalho observou que o progresso de glicação na matriz seca indica que a estabilidade da HbA1c é um problema na matriz seca de sangue total. Verougstraete e colegas exploraram a viabilidade do monitoramento de HbA1c com amostragem VAMS em casa e análise em laboratório por CEX-HPLC (VEROUGSTRAETE; LAPAUW; VAN AKEN; DELANGHE *et al.*, 2017). Eles observaram maior concordância com o sangue venoso padronizado quando as amostras de VAMS foram analisadas em 1 a 3 dias em comparação com aquelas analisadas em 4 a 6 dias, mas mesmo a análise em 3 dias, não obtiveram resultados que atendiam aos padrões de desempenho desejáveis. Este mesmo efeito do tempo de análise em DBS também foi observado por Mastronardi e colaboradores em 2015, mas em amostras de matriz DBS (MASTRONARDI; WHITTLE; TUNNINGLEY; NEEMAN *et al.*, 2015).

Para um próximo ensaio, devemos cogitar o aumento de condições testadas, como a temperatura refrigerada e a inclusão de mais dias intermediários aos testados neste primeiro momento. Além do mais, aumentar a amostragem permitiria uma visão mais ampla sobre possíveis efeitos de degradação da Hb.

5. Conclusão

Neste estudo, exploramos novas e promissoras ferramentas diagnósticas. A amostragem VAMS é uma técnica que alia fatores como maior comodidade ao paciente com praticidade de coleta e transporte. O método de preparo de amostra para análise proteômica é altamente automatizado e permite a análise de centenas de amostras por dia com pouca intervenção humana.

Na validação analítica da quantificação da HbA1c, a imprecisão do método foi acima do permitido para o acompanhamento da diabetes mellitus. De fato, o erro analítico total permitido na determinação de HbA1c é um dos menores dentre os marcadores laboratoriais. No entanto, a maior parte dos marcadores laboratoriais requerem erros totais da ordem de 10% ou mais. Dessa forma, nossos resultados indicam que a abordagem de aquisição utilizada pode ser empregada para a determinação de outros marcadores proteicos no sangue total. Mais estudos serão necessários para avaliar as muitas possibilidades através dessa técnica proteômica.

O método se mostrou bastante eficaz na identificação das principais hemoglobinas variantes como por exemplo HbS, HbD, HbC, Hb Hasharon e Hb Hope. Na amostragem pequena analisada já foi possível revelar duas variantes raras Hb Woodville e Hb Okayama, não diagnosticadas pelos métodos de referência. A combinação de múltiplos qualificadores na identificação das variantes, em especial, à aplicação de bibliotecas espectrais aumentam a confiabilidade nas identificações.

REFERÊNCIAS¹

2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes-2020. **Diabetes Care**, 43, n. Suppl 1, p. S14-s31, Jan 2020.

ABBOTT, C. A.; MALIK, R. A.; VAN ROSS, E. R.; KULKARNI, J. *et al.* Prevalence and characteristics of painful diabetic neuropathy in a large community-based diabetic population in the U.K. **Diabetes Care**, 34, n. 10, p. 2220-2224, Oct 2011.

ACHOUR, A.; KOOPMANN, T. T.; BAAS, F.; HARTEVELD, C. L. The Evolving Role of Next-Generation Sequencing in Screening and Diagnosis of Hemoglobinopathies. **Frontiers in Physiology**, 12, 2021.

AEBERSOLD, R.; MANN, M. Mass spectrometry-based proteomics. **Nature**, 422, n. 6928, p. 198-207, 2003.

AHMED, A. M. History of diabetes mellitus. **Saudi Med J**, 23, n. 4, p. 373-378, Apr 2002.

ALLEN, D. W.; SCHROEDER, W. A.; BALOG, J. Observations on the chromatographic heterogeneity of normal adult and fetal human hemoglobin: a study of the effects of crystallization and chromatography on the heterogeneity and isoleucine content. **Journal of the American Chemical Society**, 80, n. 7, p. 1628-1634, 1958.

ANGASTINIOTIS, M.; MODELL, B. Global epidemiology of hemoglobin disorders. **Ann N Y Acad Sci**, 850, p. 251-269, Jun 30 1998.

ATALAY, E. O.; KOYUNCU, H.; TURGUT, B.; ATALAY, A. *et al.* High incidence of Hb D-Los Angeles [β 121(GH4)Glu \rightarrow Gln] in Denizli Province, Aegean region of Turkey. **Hemoglobin**, 29, n. 4, p. 307-310, 2005.

ATKINSON, M. A.; EISENBARTH, G. S.; MICHELS, A. W. Type 1 diabetes. **The Lancet**, 383, n. 9911, p. 69-82, 2014/01/04/ 2014.

BAGHERNAJAD-SALEHI, L.; D'APICE, M. R.; BABAMETO-LAKU, A.; BIANCOLELLA, M. *et al.* A pilot beta-thalassaemia screening program in the Albanian population for a health planning program. **Acta haematologica**, 121, n. 4, p. 234-238, 2009.

BAGLIONI, C. Abnormal human haemoglobins VIII. chemical studies on haemoglobin D. **Biochimica et Biophysica Acta**, 59, n. 2, p. 437-449, 1962/05/21/ 1962.

BANG, I. **Ein Verfahren zur Mikrobestimmung von Blutbestandteilen**. C.W.K. Glycerup, 1913. (Acta universitatis Lundensis. NF.2,9,9.

BENZER, S.; INGRAM, V. M.; LEHMANN, H. Three varieties of human haemoglobin D. **Nature**, 182, p. 852-854, 1958.

BIERHAUS, A.; HOFMANN, M. A.; ZIEGLER, R.; NAWROTH, P. P. AGEs and their interaction with AGE-receptors in vascular disease and diabetes mellitus. I. The AGE concept. **Cardiovasc Res**, 37, n. 3, p. 586-600, Mar 1998.

BLAS, E.; KURUP, A. S. **Equity, social determinants and public health programmes**. Geneva: World health organization (WHO), 2010. 9789241563970 (pbk.)

9241563974 (pbk.).

BOND, W.; FAVERO, M.; PETERSEN, N.; GRAVELLE, C. *et al.* Survival of hepatitis B virus after drying and storage for one week. **Survival of hepatitis B virus after drying and storage for one week.**, 1, p. 550-551, 1981.

BORBELY, N.; PHELAN, L.; SZYDLO, R.; BAIN, B. Capillary zone electrophoresis for haemoglobinopathy diagnosis. **Journal of Clinical Pathology**, 66, n. 1, p. 29, 2013.

BRY, L.; CHEN, P. C.; SACKS, D. B. Effects of hemoglobin variants and chemically modified derivatives on assays for glycohemoglobin. **Clinical chemistry**, 47, n. 2, p. 153-163, 2001.

BRY, L.; CHEN, P. C.; SACKS, D. B. Effects of hemoglobin variants and chemically modified derivatives on assays for glycohemoglobin. **Clin Chem**, 47, n. 2, p. 153-163, Feb 2001.

BURNETT, J. E. C. Dried blood spot sampling: practical considerations and recommendation for use with preclinical studies. **Bioanalysis**, 3, n. 10, p. 1099-1107, 2011.

CARDOZO, K. H. M.; LEBKUCHEN, A.; OKAI, G. G.; SCHUCH, R. A. *et al.* Establishing a mass spectrometry-based system for rapid detection of SARS-CoV-2 in large clinical sample cohorts. **Nat Commun**, 11, n. 1, p. 6201, Dec 3 2020.

CARTA, M.; DALL'OLIO, G.; SOFFIATI, G. Determination of HbA1c in the presence of haemoglobin variants: comparison of three HPLC techniques. **Eur J Clin Chem Clin Biochem**, 35, n. 12, p. 923-925, Dec 1997.

CARVALHO, P. C.; HAN, X.; XU, T.; COCIORVA, D. *et al.* XDIA: improving on the label-free data-independent analysis. **Bioinformatics**, 26, n. 6, p. 847-848, 2010.

CHAM, J. A.; BIANCO, L.; BESSANT, C. Free computational resources for designing selected reaction monitoring transitions. **PROTEOMICS**, 10, n. 6, p. 1106-1126, 2010/03/01 2010.

CHARACHE, S.; MONDZAC, A. M.; GESSNER, U. Hemoglobin Hasharon (α 2 47 his (CD5) β 2): a hemoglobin found in low concentration. **The Journal of clinical investigation**, 48, n. 5, p. 834-847, 1969.

CHETAN, M. R.; THROWER, S. L.; NARENDRAN, P. What is type 1 diabetes? **Medicine**, 47, n. 1, p. 5-9, 2019/01/01/ 2019.

CHO, N. H.; SHAW, J. E.; KARURANGA, S.; HUANG, Y. *et al.* IDF Diabetes Atlas: Global estimates of diabetes prevalence for 2017 and projections for 2045. **Diabetes Res Clin Pract**, 138, p. 271-281, Apr 2018.

COLE, R. A.; SOELDNER, J. S.; DUNN, P. J.; BUNN, H. F. A rapid method for the determination of glycosylated hemoglobins using high pressure liquid chromatography. **Metabolism**, 27, n. 3, p. 289-301, 1978.

COLOSIMO, A.; GATTA, V.; GUIDA, V.; LEODORI, E. *et al.* Application of MLPA assay to characterize unsolved α -globin gene rearrangements. **Blood Cells, Molecules, and Diseases**, 46, n. 2, p. 139-144, 2011.

CONSORTIUM, U. UniProt: the universal protein knowledgebase in 2021. **Nucleic Acids Res**, 49, n. D1, p. D480-D489, 01 08 2021.

CORRAN, P. H.; COOK, J.; LYNCH, C.; LEENDERTSE, H. *et al.* Dried blood spots as a source of anti-malarial antibodies for epidemiological studies. **Malaria journal**, 7, n. 1, p. 1-12, 2008.

CULLY, M.; BURNS, G.; ENGEL, W. D. Homogeneous immunoturbidimetric determination of hemoglobin HbA1c. **Boehringer Mannheim, East Sussex, UK**, 1992.

DANIEL, Y.; ELION, J.; ALLAF, B.; BADENS, C. *et al.* Newborn screening for sickle cell disease in Europe. **International Journal of Neonatal Screening**, 5, n. 1, p. 15, 2019.

DAS, R.; MITRA, G.; MATHEW, B.; ROSS, C. *et al.* Automated Analysis of Hemoglobin Variants Using NanoLC-MS and Customized Databases. **Journal of Proteome Research**, 12, n. 7, p. 3215-3222, 2013/07/05 2013.

DASAUNI, P.; CHHABRA, V.; KUMAR, G.; KUNDU, S. Advances in mass spectrometric methods for detection of hemoglobin disorders. **Analytical Biochemistry**, p. 114314, 2021/07/23/ 2021.

DAVIES, S. C.; CRONIN, E.; GILL, M.; GREENGROSS, P. *et al.* Screening for sickle cell disease and thalassaemia: a systematic review with supplementary research. **Health technology assessment (Winchester, England)**, 4, n. 3, p. i-v, 2000.

DAVIS, R. E. A rapid simplified method for routine measurement of glycosylated haemoglobin. 1978.

DE CASTRO LOBO, C. L.; BALLAS, S. K.; DOMINGOS, A. C. B.; MOURA, P. G. *et al.* Newborn screening program for hemoglobinopathies in Rio de Janeiro, Brazil. **Pediatric blood & cancer**, 61, n. 1, p. 34-39, 2014.

DE KESEL, P. M. M.; SADONES, N.; CAPIAU, S.; LAMBERT, W. E. *et al.* Hemato-critical issues in quantitative analysis of dried blood spots: challenges and solutions. **Bioanalysis**, 5, n. 16, p. 2023-2041, 2013.

DE VRIES, R.; BARFIELD, M.; VAN DE MERBEL, N.; SCHMID, B. *et al.* The effect of hematocrit on bioanalysis of DBS: results from the EBF DBS-microsampling consortium. **Bioanalysis**, 5, n. 17, p. 2147-2160, 2013.

DENNIFF, P.; SPOONER, N. The effect of hematocrit on assay bias when using DBS samples for the quantitative bioanalysis of drugs. **Bioanalysis**, 2, n. 8, p. 1385-1395, 2010.

DENNIFF, P.; SPOONER, N. Volumetric absorptive microsampling: a dried sample collection technique for quantitative bioanalysis. **Analytical chemistry**, 86, n. 16, p. 8489-8495, 2014.

DEUTSCH, E. W.; MENDOZA, L.; SHTEYNBERG, D.; FARRAH, T. *et al.* A guided tour of the Trans-Proteomic Pipeline. **Proteomics**, 10, n. 6, p. 1150-1159, Mar 2010.

DHATT, G. S.; AGARWAL, M. M.; BISHAWI, B. HbA1c: a comparison of NGSP with IFCC transformed values. **Clin Chim Acta**, 358, n. 1-2, p. 81-86, Aug 2005.

DRAPEAU, G. R.; BOILY, Y.; HOUMARD, J. Purification and properties of an extracellular protease of *Staphylococcus aureus*. **J Biol Chem**, 247, n. 20, p. 6720-6726, Oct 25 1972.

DUNN, P. J.; COLE, R. A.; SOELDNER, J. S. Further development and automation of a high pressure liquid chromatography method for the determination of glycosylated hemoglobins. **Metabolism**, 28, n. 7, p. 777-779, 1979/07/01/ 1979.

EBERLE, S. J. E.; TORRES, A. S. F. Hemoglobinas inestables. **Acta bioquímica clínica latinoamericana**, 51, n. 3, p. 343-347, 2017.

EVENGARD, B.; VON SYDOW, M.; EHRNST, A.; PEHRSON, P. O. *et al.* Filter paper sampling of blood infected with HIV: effect of heat on antibody activity and viral infectivity. **BMJ: British Medical Journal**, 297, n. 6657, p. 1178, 1988.

FAN, L.; LEE, J. A. Managing the effect of hematocrit on DBS analysis in a regulated environment. **Bioanalysis**, 4, n. 4, p. 345-347, 2012.

FARASHI, S.; HARTEVELD, C. L. Molecular basis of α -thalassemia. **Blood Cells, Molecules, and Diseases**, 70, p. 43-53, 2018.

FARID, Y.; BOWMAN, N. S.; LECAT, P. Biochemistry, hemoglobin synthesis. 2019.

FOKKEMA, M. R.; BAKKER, A. J.; DE BOER, F.; KOOISTRA, J. *et al.* HbA1c measurements from dried blood spots: validation and patient satisfaction. **Clinical chemistry and laboratory medicine**, 47, n. 10, p. 1259-1264, 2009.

GALLIENNE, A. E.; IBERSON, N. M.; DRÉAU, H. M.; JACKSON, H. *et al.* Characterization of a novel deletion causing β -thalassemia major in an Afghan family. **Hemoglobin**, 34, n. 1, p. 110-114, 2010.

GESSULAT, S.; SCHMIDT, T.; ZOLG, D. P.; SAMARAS, P. *et al.* Prosit: proteome-wide prediction of peptide tandem mass spectra by deep learning. **Nat Methods**, 16, n. 6, p. 509-518, 06 2019.

GIARDINE, B.; BORG, J.; VIENNAS, E.; PAVLIDIS, C. *et al.* Updates of the HbVar database of human hemoglobin variants and thalassemia mutations. **Nucleic acids research**, 42, n. D1, p. D1063-D1069, 2014.

GIARDINE, B.; VAN BAAL, S.; KAIMAKIS, P.; RIEMER, C. *et al.* HbVar database of human hemoglobin variants and thalassemia mutations: 2007 update. **Human mutation**, 28, n. 2, p. 206-206, 2007.

GILLET, L. C.; NAVARRO, P.; TATE, S.; RÖST, H. *et al.* Targeted Data Extraction of the MS/MS Spectra Generated by Data-independent Acquisition: A New Concept for Consistent and Accurate Proteome Analysis. **Molecular & Cellular Proteomics**, 11, n. 6, p. O111.016717, 2012.

GIORDANO, P. C. Strategies for basic laboratory diagnostics of the hemoglobinopathies in multi-ethnic societies: interpretation of results and pitfalls. **International journal of laboratory hematology**, 35, n. 5, p. 465-479, 2013.

GREENE, D. N.; PYLE, A. L.; CHANG, J. S.; HOKE, C. *et al.* Comparison of Sebia Capillarys Flex capillary electrophoresis with the BioRad Variant II high pressure liquid chromatography in the evaluation of hemoglobinopathies. **Clinica Chimica Acta**, 413, n. 15-16, p. 1232-1238, 2012.

GREENE, D. N.; VAUGHN, C. P.; CREWS, B. O.; AGARWAL, A. M. Advances in detection of hemoglobinopathies. **Clinica chimica acta**, 439, p. 50-57, 2015.

GULANI, A.; WEILER, T. Genetics, autosomal recessive. **StatPearls [Internet]**, 2020.

HE, L.; ROCKWOOD, A. L.; AGARWAL, A. M.; ANDERSON, L. C. *et al.* Diagnosis of Hemoglobinopathy and β -Thalassemia by 21 Tesla Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry and Tandem Mass Spectrometry of Hemoglobin from Blood. **Clinical Chemistry**, 65, n. 8, p. 986-994, 2019.

HELMICH, F.; VAN DONGEN, J. L. J.; KUIJPER, P. H. M.; SCHARNHORST, V. *et al.* Rapid phenotype hemoglobin screening by high-resolution mass spectrometry on intact proteins. **Clinica Chimica Acta**, 460, p. 220-226, 2016/09/01/ 2016.

HIGGINS, T.; MACK, M.; KHAJURIA, A. Comparison of two methods for the quantification and identification of hemoglobin variants. **Clinical biochemistry**, 42, n. 7-8, p. 701-705, 2009.

HODGE, J. E. Dehydrated Foods, Chemistry of Browning Reactions in Model Systems. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 1, n. 15, p. 928-943, 1953/10/01 1953.

HOELZEL, W.; WEYKAMP, C.; JEPPSSON, J.-O.; MIEDEMA, K. *et al.* IFCC reference system for measurement of hemoglobin A1c in human blood and the national standardization schemes in the United States, Japan, and Sweden: a method-comparison study. **Clinical chemistry**, 50, n. 1, p. 166-174, 2004.

HU, A.; NOBLE, W. S.; WOLF-YADLIN, A. Technical advances in proteomics: new developments in data-independent acquisition. **F1000Research**, 5, p. F1000 Faculty Rev-1419, 2016.

HUISMAN, T. H. J.; CARVER, M. F. H.; EFREMOV, G. **A syllabus of human hemoglobin variants (1996)**. Sickle Cell Anemia Foundation Augusta, GA, 1996.

ITANO, H. A. A Third Abnormal Hemoglobin Associated with Hereditary Hemolytic Anemia. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 37, n. 12, p. 775-784, 1951.

JAISSON, S.; LEROY, N.; DESROCHES, C.; TONYE-LIBYH, M. *et al.* Interference of the most frequent haemoglobin variants on quantification of HbA1c: comparison between the LC-MS (IFCC reference method) and three routinely used methods. **Diabetes Metab**, 39, n. 4, p. 363-369, Sep 2013.

JAVID, J.; PETTIS, P. K.; KOENIG, R. J.; CERAMI, A. Immunologic characterization and quantification of haemoglobin A1c. **British journal of haematology**, 38, n. 3, p. 329-337, 1978.

JEPPSSON, J.-O.; KOBOLD, U.; BARR, J.; FINKE, A. *et al.* Approved IFCC reference method for the measurement of HbA1c in human blood. 2002.

JEPPSSON, J. O.; JERNTORP, P.; SUNDKVIST, G.; ENGLUND, H. *et al.* Measurement of hemoglobin A1c by a new liquid-chromatographic assay: methodology, clinical utility, and relation to glucose tolerance evaluated. **Clinical chemistry**, 32, n. 10, p. 1867-1872, 1986.

JOHN, W. G. Enzyme immunoassay: a new method for the estimation of haemoglobin A1c. **Clin Chem**, 39, p. 663-666, 1993.

JOHN, W. G. Haemoglobin A1c: analysis and standardisation. **Clin Chem Lab Med**, 41, n. 9, p. 1199-1212, Sep 2003.

KAR, R.; SHARMA, C. B. Bilirubin peak can be mistaken as Hb Bart's or Hb H on High-performance liquid chromatography. **Hemoglobin**, 35, n. 2, p. 171-174, 2011.

KELLEHER, N. L.; LIN, H. Y.; VALASKOVIC, G. A.; AASERUD, D. J. *et al.* Top down versus bottom up protein characterization by tandem high-resolution mass spectrometry. **Journal of the American Chemical Society**, 121, n. 4, p. 806-812, 1999.

KEREN, D. F.; HEDSTROM, D.; GULBRANSON, R.; OU, C.-N. *et al.* Comparison of Sebia Capillary capillary electrophoresis with the Primus high-pressure liquid chromatography in the evaluation of hemoglobinopathies. **American journal of clinical pathology**, 130, n. 5, p. 824-831, 2008.

KHUU, H. M.; ROBINSON, C. A.; GOOLSBY, K.; HARDY, R. W. *et al.* Evaluation of a fully automated high-performance liquid chromatography assay for hemoglobin A1c. **Arch Pathol Lab Med**, 123, n. 9, p. 763-767, Sep 1999.

KUSEBAUCH, U.; CAMPBELL, D. S.; DEUTSCH, E. W.; CHU, C. S. *et al.* Human SRMAtlas: A Resource of Targeted Assays to Quantify the Complete Human Proteome. **Cell**, 166, n. 3, p. 766-778, 2016/07/28/ 2016.

KUTLAR, F. Diagnostic approach to hemoglobinopathies. **Hemoglobin**, 31, n. 2, p. 243-250, 2007.

LANGE, V.; PICOTTI, P.; DOMON, B.; AEBERSOLD, R. Selected reaction monitoring for quantitative proteomics: a tutorial. **Molecular Systems Biology**, 4, n. 1, p. 222, 2008/01/01 2008.

LASSOUT, O.; HARTMER, R.; JABS, W.; CLERICI, L. *et al.* Clinical method evaluation of hemoglobin S and C identification by top-down selected reaction monitoring and electron transfer dissociation. **Clinical proteomics**, 16, n. 1, p. 1-9, 2019.

LAVELLE, N. C. Bases moleculares e aspectos diagnósticos das Talassemias Alfa e Beta no Brasil. 2019.

LEONE, L.; MONTELEONE, M.; GABUTTI, V.; AMIONE, C. Reversed-phase high-performance liquid chromatography of human haemoglobin chains. **Journal of Chromatography A**, 321, p. 407-419, 1985.

LEUNG, T. N.; LAU, T. K.; CHUNG, T. K. H. Thalassaemia screening in pregnancy. **Current opinion in Obstetrics and Gynecology**, 17, n. 2, p. 129-134, 2005.

LI, D.; LIAO, C.; LI, J.; HUANG, Y. *et al.* Prenatal diagnosis of β -thalassemia by reverse dot-blot hybridization in southern China. **Hemoglobin**, 30, n. 3, p. 365-370, 2006.

LI, H.-J.; ZHAO, X.-N.; QIN, F.; LI, H.-W. *et al.* Abnormal hemoglobins in the Silk Road region of China. **Human genetics**, 86, n. 2, p. 231-235, 1990.

LI, W.; TSE, F. L. S. Dried blood spot sampling in combination with LC-MS/MS for quantitative analysis of small molecules. **Biomedical Chromatography**, 24, n. 1, p. 49-65, 2010.

LIN, M.; ZHU, J.-J.; WANG, Q.; XIE, L.-X. *et al.* Development and evaluation of a reverse dot blot assay for the simultaneous detection of common alpha and beta thalassemia in Chinese. **Blood Cells, Molecules, and Diseases**, 48, n. 2, p. 86-90, 2012.

LITTLE, R. R.; LA'ULU, S. L.; HANSON, S. E.; ROHLFING, C. L. *et al.* Effects of 49 Different Rare Hb Variants on HbA1c Measurement in Eight Methods. **Journal of Diabetes Science and Technology**, 9, n. 4, p. 849-856, 2015/07/01 2015.

LITTLE, R. R.; ROHLFING, C. L.; SACKS, D. B. Status of hemoglobin A1c measurement and goals for improvement: from chaos to order for improving diabetes care. **Clin Chem**, 57, n. 2, p. 205-214, Feb 2011.

LITTLE, S. Amplification-refractory mutation system (ARMS) analysis of point mutations. **Current protocols in human genetics**, 7, n. 1, p. 9-8, 1995.

LIU, H.; SADYGOV, R. G.; YATES, J. R. A Model for Random Sampling and Estimation of Relative Protein Abundance in Shotgun Proteomics. **Analytical Chemistry**, 76, n. 14, p. 4193-4201, 2004/07/01 2004.

LIU, J.-Z.; HAN, H.; SCHOUTEN, J. P.; WANG, L.-R. *et al.* Detection of α -thalassemia in China by using multiplex ligation-dependent probe amplification. **Hemoglobin**, 32, n. 6, p. 561-571, 2008.

LIU, S.; WANG, Y. Mass spectrometry for the assessment of the occurrence and biological consequences of DNA adducts. **Chemical Society Reviews**, 44, n. 21, p. 7829-7854, 2015.

MALLIA, A. K.; HERMANSON, G. T.; KROHN, R. I.; FUJIMOTO, E. K. *et al.* Preparation and use of a boronic acid affinity support for separation and quantitation of glycosylated hemoglobins. **Analytical Letters, Part B: Clinical and Biochemical Analysis**, 14, n. 8, p. 649-661, 1981.

MANDRIOLI, R.; MERCOLINI, L.; PROTTI, M. Blood and plasma volumetric absorptive microsampling (VAMS) coupled to LC-MS/MS for the forensic assessment of cocaine consumption. **Molecules**, 25, n. 5, p. 1046, 2020.

MANTIKOU, E.; ARKESTEIJN, S. G.; KERKHOFFS, J.-L.; HARTEVELD, C. L. *et al.* A brief review on newborn screening methods for hemoglobinopathies and preliminary results selecting beta thalassemia carriers at birth by quantitative estimation of the HbA fraction. **Clinical biochemistry**, 42, n. 18, p. 1780-1785, 2009.

MASTRONARDI, C. A.; WHITTLE, B.; TUNNINGLEY, R.; NEEMAN, T. *et al.* The use of dried blood spot sampling for the measurement of HbA1c: a cross-sectional study. **BMC clinical pathology**, v.15, p. 13, DOI: 10.1186/s12907-015-0013-5. Acesso em: 2015.

MEE, J. M. L.; KORTH, J.; HALPERN, B. Rapid and quantitative blood analysis for free fatty acids by chemical ionization mass spectrometry. **Analytical Letters**, 9, n. 12, p. 1075-1083, 1976.

MEI, J. V.; ALEXANDER, J. R.; ADAM, B. W.; HANNON, W. H. Use of filter paper for the collection and analysis of human whole blood specimens. **J Nutr**, 131, n. 5, p. 1631s-1636s, May 2001.

MEI, J. V.; HANNON, W. H.; DOBBS, T. L.; BELL, C. J. *et al.* Radioimmunoassay for monitoring zidovudine in dried blood spot specimens. **Clinical chemistry**, 44, n. 2, p. 281-286, 1998.

MERTON, G.; JONES, K.; LEE, M.; JOHNSTON, A. *et al.* Accuracy of cyclosporin measurements made in capillary blood samples obtained by skin puncture. **Therapeutic drug monitoring**, 22, n. 5, p. 594-598, 2000.

MIDDLE, F. A.; BANNISTER, A.; BELLINGHAM, A. J.; DEAN, P. D. G. Separation of glycosylated haemoglobins using immobilized phenylboronic acid. Effect of ligand concentration, column operating conditions, and comparison with ion-exchange and isoelectric-focusing. **Biochemical Journal**, 209, n. 3, p. 771-779, 1983.

MODELL, B.; DARLISON, M. Global epidemiology of haemoglobin disorders and derived service indicators. **Bulletin of the World Health Organization**, 86, n. 6, p. 480-487, 2008.

MOSCA, A.; GOODALL, I.; HOSHINO, T.; JEPSSON, J. O. *et al.* Global standardization of glycated hemoglobin measurement: the position of the IFCC Working Group. **Clin Chem Lab Med**, 45, n. 8, p. 1077-1080, 2007.

NAKANISHI, T.; MIYAZAKI, A.; IGUCHI, K.; SHIMIZU, A. Effect of hemoglobin variants on routine glycohemoglobin measurements assessed by a mass spectrometric method. **Clin Chem**, 46, n. 10, p. 1689-1692, Oct 2000.

NATHAN, D. M.; GENUTH, S.; LACHIN, J.; CLEARY, P. *et al.* The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. **N Engl J Med**, 329, n. 14, p. 977-986, Sep 30 1993.

National Diabetes Statistics Report. PREVENTION., C. F. D. C. A. Atlanta, GA: Centers for Disease Control and Prevention , US Department of Health and Human Services; 2017.

NELSON, K. B.; DAMBROSIA, J. M.; GREYER, J. K.; PHILLIPS, T. M. Neonatal cytokines and coagulation factors in children with cerebral palsy. **Annals of Neurology: Official Journal of the American Neurological Association and the Child Neurology Society**, 44, n. 4, p. 665-675, 1998.

NIGAM, P. K.; SHARMA, S.; SAREEN, R.; PAUL, V. *et al.* Lack of precision in HbA(1c) values on variant II in cases of hemoglobin Q India. **Indian J Clin Biochem**, 21, n. 2, p. 72-75, Sep 2006.

OGURTSOVA, K.; DA ROCHA FERNANDES, J. D.; HUANG, Y.; LINNENKAMP, U. *et al.* IDF Diabetes Atlas: Global estimates for the prevalence of diabetes for 2015 and 2040. **Diabetes Res Clin Pract**, 128, p. 40-50, Jun 2017.

OLD, J. M. Screening and genetic diagnosis of haemoglobinopathies. **Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation**, 67, n. 1, p. 71-86, 2007/01/01 2007.

PANDEY, S.; MISHRA, R. M.; PANDEY, S.; SHAH, V. *et al.* Molecular characterization of hemoglobin D Punjab traits and clinical-hematological profile of the patients. **Sao Paulo Medical Journal**, 130, n. 4, p. 248-251, 2012.

PATLAK, M. New weapons to combat an ancient disease: treating diabetes. **Faseb j**, 16, n. 14, p. 1853, Dec 2002.

PATRINOS, G. P.; GIARDINE, B.; RIEMER, C.; MILLER, W. *et al.* Improvements in the HbVar database of human hemoglobin variants and thalassemia mutations for population and sequence variation studies. **Nucleic acids research**, 32, n. suppl_1, p. D537-D541, 2004.

PAULING, L.; ITANO, H. A.; SINGER, S. J.; WELLS, I. C. Sickle cell anemia, a molecular disease. **Science**, 110, n. 2865, p. 543-548, 1949.

PINO, L. K.; SEARLE, B. C.; BOLLINGER, J. G.; NUNN, B. *et al.* The Skyline ecosystem: Informatics for quantitative mass spectrometry proteomics. **Mass spectrometry reviews**, 39, n. 3, p. 229-244, 2020.

RAI, D. K.; ALVELIUS, G.; LANDIN, B.; GRIFFITHS, W. J. Electrospray tandem mass spectrometry in the rapid identification of α -chain haemoglobin variants. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, 14, n. 14, p. 1184-1194, 2000.

RAI, D. K.; LANDIN, B.; ALVELIUS, G.; GRIFFITHS, W. J. Electrospray tandem mass spectrometry of intact β -chain hemoglobin variants. **Analytical chemistry**, 74, n. 9, p. 2097-2102, 2002.

RAI, P.; MALIK, P. Gene therapy for hemoglobin disorders-a mini-review. **Journal of rare diseases research & treatment**, 1, n. 2, p. 25, 2016.

RHEA, J. M.; MOLINARO, R. Pathology consultation on HbA1c methods and interferences. **American journal of clinical pathology**, 141, n. 1, p. 5-16, 2014.

ROBERTS, W. L.; CHIASERA, J. M.; WARD-COOK, K. M. Glycohemoglobin results in samples with hemoglobin C or S trait: a comparison of four test systems. **Clin Chem**, 45, n. 6 Pt 1, p. 906-909, Jun 1999.

ROBERTS, W. L.; FRANK, E. L.; MOULTON, L.; PAPADEA, C. *et al.* Effects of nine hemoglobin variants on five glycohemoglobin methods. **Clin Chem**, 46, n. 4, p. 569-572, Apr 2000.

SACKS, D. B.; ARNOLD, M.; BAKRIS, G. L.; BRUNS, D. E. *et al.* Guidelines and recommendations for laboratory analysis in the diagnosis and management of diabetes mellitus. **Diabetes Care**, 34, n. 6, p. e61-99, Jun 2011.

SANDOVAL-LIRA, J.; MONDRAGÓN-SOLÓRZANO, G.; LUGO-FUENTES, L. I.; BARROSO-FLORES, J. Accurate Estimation of pK_b Values for Amino Groups from Surface Electrostatic Potential (VS_{min}) Calculations: The Isoelectric Points of Amino Acids as a Case Study. **Journal of Chemical Information and Modeling**, 60, n. 3, p. 1445-1452, 2020/03/23 2020.

SAW, S.; LOH, T. P.; YIN, C.; SETHI, S. K. Identification of hemoglobin variants in samples received for glycosylated hemoglobin testing. **Clinica Chimica Acta**, 415, p. 173-175, 2013.

SHANG, X.; PENG, Z.; YE, Y.; ASAN *et al.* Rapid Targeted Next-Generation Sequencing Platform for Molecular Screening and Clinical Genotyping in Subjects with Hemoglobinopathies. **EBioMedicine**, 23, p. 150-159, 2017.

SIN, S. Y.; GHOSH, A.; TANG, L. C. H.; CHAN, V. Ten years' experience of antenatal mean corpuscular volume screening and prenatal diagnosis for thalassaemias in Hong Kong. **Journal of Obstetrics and Gynaecology Research**, 26, n. 3, p. 203-208, 2000.

SIUTI, N.; KELLEHER, N. L. Decoding protein modifications using top-down mass spectrometry. **Nature methods**, 4, n. 10, p. 817-821, 2007.

SPOONER, N.; DENNIFF, P.; MICHELSEN, L.; DE VRIES, R. *et al.* A device for dried blood microsampling in quantitative bioanalysis: overcoming the issues associated blood hematocrit. **Bioanalysis**, 7, n. 6, p. 653-659, 2015.

SPOONER, N.; RAMAKRISHNAN, Y.; BARFIELD, M.; DEWIT, O. *et al.* Use of DBS sample collection to determine circulating drug concentrations in clinical trials: practicalities and considerations. **Bioanalysis**, 2, n. 8, p. 1515-1522, 2010.

Standards of Medical Care in Diabetes-2016: Summary of Revisions. **Diabetes Care**, 39 Suppl 1, p. S4-5, Jan 2016.

STRATTON, I. M.; ADLER, A. I.; NEIL, H. A. W.; MATTHEWS, D. R. *et al.* Association of glycaemia with macrovascular and microvascular complications of type 2 diabetes (UKPDS 35): prospective observational study. **BMJ**, 321, n. 7258, p. 405, 2000.

TAN, A. S. C.; QUAH, T. C.; LOW, P. S.; CHONG, S. S. A rapid and reliable 7-deletion multiplex polymerase chain reaction assay for α -thalassemia. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, 98, n. 1, p. 250-251, 2001.

THEIN, S. L. Molecular basis of β thalassemia and potential therapeutic targets. **Blood Cells, Molecules, and Diseases**, 70, p. 54-65, 2018.

THÉBERGE, R.; DIKLER, S.; HECKENDORF, C.; CHUI, D. H. K. *et al.* MALDI-MS mass spectrometry analysis of hemoglobin variants: a top-down approach to the characterization of hemoglobinopathies. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, 26, n. 8, p. 1299-1310, 2015.

TIMMERMAN, P.; WHITE, S.; GLOBIG, S.; LÜDTKE, S. *et al.* EBF recommendation on the validation of bioanalytical methods for dried blood spots. **Bioanalysis**, 3, n. 14, p. 1567-1575, 2011.

TITUS, H. J.; HUISMAN, T. H. J.; CARVER, M. F. H.; BAYSAL, E. A syllabus of thalassemia mutations. **Augusta: The Sickle Cell Anemia Foundation**, 1997.

VAN ZWIETEN, R.; VELDTHUIS, M.; DELZENNE, B.; BERGHUIS, J. *et al.* Hemoglobin analyses in the Netherlands reveal more than 80 different variants including six novel ones. **Hemoglobin**, 38, n. 1, p. 1-7, 2014.

VELLA, F.; LEHMANN, H. Haemoglobin D Punjab (D Los Angeles). **Journal of Medical Genetics**, 11, n. 4, p. 341, 1974.

VENABLE, J. D.; DONG, M. Q.; WOHLSCHEGEL, J.; DILLIN, A. *et al.* Automated approach for quantitative analysis of complex peptide mixtures from tandem mass spectra. **Nat Methods**, 1, n. 1, p. 39-45, Oct 2004.

VEROUGSTRAETE, N.; LAPAUW, B.; VAN AKEN, S.; DELANGHE, J. *et al.* Volumetric absorptive microsampling at home as an alternative tool for the monitoring of HbA1c in diabetes patients. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)**, 55, n. 3, p. 462-469, 2017.

WADA, Y.; HAYASHI, A.; FUJITA, T.; MATSUO, T. *et al.* Structural analysis of human hemoglobin variants with field desorption mass spectrometry. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure**, 667, n. 2, p. 233-241, 1981.

WAGNER, M.; TONOLI, D.; VARESIO, E.; HOPFGARTNER, G. The use of mass spectrometry to analyze dried blood spots. **Mass Spectrometry Reviews**, 35, n. 3, p. 361-438, 2016/05/01 2016.
<https://doi.org/10.1002/mas.21441>.

WANG, M.; WANG, C.; HAN, X. Selection of internal standards for accurate quantification of complex lipid species in biological extracts by electrospray ionization mass spectrometry—What, how and why? **Mass spectrometry reviews**, 36, n. 6, p. 693-714, 2017.

WEYKAMP, C. W.; PENDERS, T. J.; SIEBELDER, C. W.; MUSKIET, F. A. *et al.* Interference of carbamylated and acetylated hemoglobins in assays of glycohemoglobin by HPLC, electrophoresis, affinity chromatography, and enzyme immunoassay. **Clin Chem**, 39, n. 1, p. 138-142, Jan 1993.

WILCKEN, B.; WILEY, V. Newborn screening. **Pathology**, 40, n. 2, p. 104-115, Feb 2008.

WILD, B. J.; GREEN, B. N.; COOPER, E. K.; LALLOZ, M. R. A. *et al.* Rapid identification of hemoglobin variants by electrospray ionization mass spectrometry. **Blood cells, molecules, and diseases**, 27, n. 3, p. 691-704, 2001.

WILD, B. J.; GREEN, B. N.; STEPHENS, A. D. The potential of electrospray ionization mass spectrometry for the diagnosis of hemoglobin variants found in newborn screening. **Blood Cells, Molecules, and Diseases**, 33, n. 3, p. 308-317, 2004.

WIŚNIEWSKI, J. R.; ZOUGMAN, A.; NAGARAJ, N.; MANN, M. Universal sample preparation method for proteome analysis. **Nature Methods**, 6, n. 5, p. 359-362, 2009/05/01 2009.

WOODS, K.; DOUKETIS, J. D.; SCHNURR, T.; KINNON, K. *et al.* Patient preferences for capillary vs. venous INR determination in an anticoagulation clinic: a randomized controlled trial. **Thrombosis research**, 114, n. 3, p. 161-165, 2004.

XU, Y. Y.; PETTERSSON, K.; BLOMBERG, K.; HEMMILÄ, I. *et al.* Simultaneous Quadruple-Label Fluorometric Immunoassay of Thyroid-Stimulating Hormone, 17 α -Hydroxyprogesterone, Immunoreactive Trypsin, and Creatine Kinase MM Isoenzyme in Dried Blood Spots. **Clinical Chemistry**, 38, n. 10, p. 2038-2043, 1992.

ZANELLA-CLEON, I.; JOLY, P.; BECCHI, M.; FRANCIANA, A. Phenotype determination of hemoglobinopathies by mass spectrometry. **Clinical Biochemistry**, 42, n. 18, p. 1807-1817, 2009/12/01/ 2009.

ZHANG, F.; GE, W.; RUAN, G.; CAI, X. *et al.* Data-independent acquisition mass spectrometry-based proteomics and software tools: a glimpse in 2020. **Proteomics**, 20, n. 17-18, p. 1900276, 2020.

ZHANG, L. **Heme biology: the secret life of heme in regulating diverse biological processes**. World scientific, 2011. 981428792X.

ZHANG, L.; VERTES, A. Single-cell mass spectrometry approaches to explore cellular heterogeneity. **Angewandte Chemie International Edition**, 57, n. 17, p. 4466-4477, 2018.

ZHANG, Y.; FONSLow, B. R.; SHAN, B.; BAEK, M.-C. *et al.* Protein Analysis by Shotgun/Bottom-up Proteomics. **Chemical Reviews**, 113, n. 4, p. 2343-2394, 2013/04/10 2013.

ZIMMET, P.; ALBERTI, K. G.; MAGLIANO, D. J.; BENNETT, P. H. Diabetes mellitus statistics on prevalence and mortality: facts and fallacies. **Nature Reviews Endocrinology**, 12, p. 616, 07/08/online 2016. Perspective.

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT NBR 6023).

ANEXOS

ANEXO A – Aprovação do Comitê de Ética



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Aplicação da proteômica direcionada na determinação da glicação A1c e fenotipagem de variantes de hemoglobina a partir da coleta de sangue em papel filtro

Pesquisador: Valdemir Melechco Carvalho

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 02241818.4.0000.5474

Instituição Proponente: Fleury S.A

Patrocinador Principal: Fleury S.A

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.062.853

Apresentação do Projeto:

A hiperglicemia está diretamente relacionada com o aparecimento de complicações crônicas no indivíduo com diabetes mellitus. Isso acontece principalmente em razão da reação não enzimática chamada glicação que resulta na modificação de diferentes biomoléculas. A hemoglobina glicada (HbA1c) é o principal marcador de controle glicêmico de longo prazo, e seus valores estão diretamente associados à quantidade de glicose disponível na corrente sanguínea.

Atualmente existem diversos métodos disponíveis para esta determinação, porém estes possuem limitações, principalmente quando na presença de hemoglobinas variantes.

Em função de sua alta especificidade, a espectrometria de massas apresenta um alto potencial em reduzir as interferências apresentadas pelos ensaios de determinação de hemoglobina A1c usados atualmente na prática clínica.

Objetivo da Pesquisa:

O presente projeto tem como objetivo o desenvolvimento e validação de um novo método para a quantificação da hemoglobina glicada (HbA1c) por meio da técnica de proteômica dirigida a partir da coleta de sangue em papel filtro.

A espectrometria de massas de alta resolução eliminaria a interferência por hemoglobinas variantes e, concomitantemente, permite a identificação de algumas das mutações de hemoglobina,

Endereço: Avenida General Valdomiro de Lima, 508
Bairro: Jabaquara **CEP:** 04.344-070
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)5014-7771 **Fax:** (11)5014-7425 **E-mail:** Instituto.fleury@grupofleury.com.br

Continuação do Parecer: 3.062.853

dispensando a necessidade da solicitação de um teste genético adicional. A coleta realizada em papel filtro facilitaria a coleta, reduziria o volume de amostra biológica necessária e aumentaria a estabilidade do material.

por meio da técnica de proteômica dirigida a partir da coleta de sangue em papel filtro; e concomitante identificação dos peptídeos diretamente associados ao tipo de fenótipo das formas anômalas mais frequentes da hemoglobina.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

No presente estudo serão utilizadas sobras de amostras coletadas nas unidades do Fleury para quantificação de HbA1c, atualmente realizadas pelas metodologias de Eletroforese capilar, HPLC por afinidade iônica e Imunoturbidimetria. Os resultados dos exames realizados por estas técnicas serão comparados aos resultados obtidos pela nova metodologia. Tais amostras serão descartadas após a execução dos testes. Nenhuma informação que possibilite a identificação do cliente estará disponível ao pesquisador, pois as amostras serão descaracterizadas. Dessa forma, esse projeto não apresenta riscos aos voluntários.

Benefícios:

Os resultados do estudo poderão revelar uma nova metodologia que aumentará a confiabilidade do resultado, com melhora da sensibilidade e especificidade do teste, além de propiciar maior praticidade na coleta por papel filtro, menor volume de sangue e em muitos casos, a dispensa de um teste molecular para a confirmação do diagnóstico.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Não há

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Não há

Recomendações:

Não há

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há

Endereço: Avenida General Valdomiro de Lima, 508
Bairro: Jabaquara CEP: 04.344-070
UF: SP Município: SAO PAULO
Telefone: (11)5014-7771 Fax: (11)5014-7425 E-mail: Instituto.fleury@grupofleury.com.br

Continuação do Parecer: 3.062.853

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1247461.pdf	30/10/2018 19:51:48		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO.pdf	30/10/2018 19:51:20	Valdemir Melechco Carvalho	Aceito
Folha de Rosto	folhaDeRosto.pdf	30/10/2018 19:50:41	Valdemir Melechco Carvalho	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	JustificativaTCLE.pdf	30/10/2018 19:48:20	Valdemir Melechco Carvalho	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 08 de Dezembro de 2018

Assinado por:

GUSTAVO ARANTES ROSA MACIEL
(Coordenador(a))

Endereço: Avenida General Valdomiro de Lima, 508
Bairro: Jabaquara CEP: 04.344-070
UF: SP Município: SAO PAULO
Telefone: (11)5014-7771 Fax: (11)5014-7425 E-mail: instituto.fleury@grupofleury.com.br

ANEXO B – Termo De Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE

SOLICITAÇÃO DA DISPENSA DO TCLE

São Paulo, 01 de outubro de 2018.

Ao Comitê de Ética em Pesquisa:

Solicito a dispensa da apresentação do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido no projeto "*Aplicação da proteômica dirigida na determinação da glicação A1c e fenotipagem de variantes de hemoglobina a partir da coleta de sangue em papel filtro*". No estudo serão realizadas apenas as dosagens dos analitos solicitados pelos participantes (Hemoglobina A1c) e não resultará em coleta de volume adicional de sangue. As amostras serão descaracterizadas e a única informação ao que o pesquisador terá acesso será a concentração do analito.

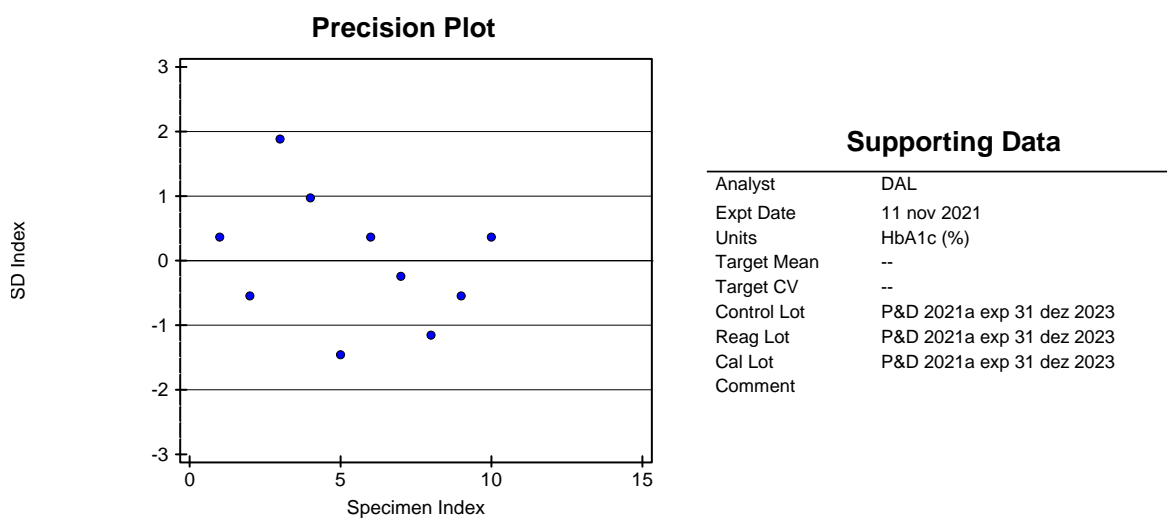


Valdemir Melechco Carvalho

ANEXO C – Resultados do estudo de imprecisão pelo programa EP Evaluator

Avaliação da imprecisão da metodologia em valores mais baixos – PREC1 (4,98%).

Precision Statistics			
Obs Mean	4,98 HbA1c (%)	95% CI for Obs Mean	4,74 to 5,22
Obs Standard Dev (SD)	0,33	Obs 2 SD Range	4,32 to 5,64
95% Confidence for Obs SD	0,23 to 0,60	Number of Specimens (N)	10 of 10
Obs Coef of Variation (CV)	6,6%		



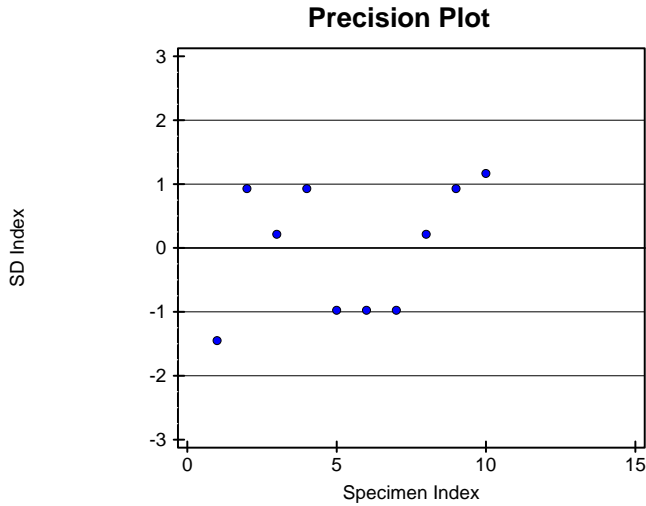
Precision Data

Index	Results	Index	Results	Index	Results	Index	Results
1	5,1	4	5,3	7	4,9	10	5,1
2	4,8	5	4,5	8	4,6		
3	5,6	6	5,1	9	4,8		

X: excluded from calculations

Avaliação da imprecisão da metodologia em valores medianos – PREC2 (6,91%).

Precision Statistics			
Obs Mean	6,91 HbA1c (%)	95% CI for Obs Mean	6,61 to 7,21
Obs Standard Dev (SD)	0,42	Obs 2 SD Range	6,07 to 7,75
95% Confidence for Obs SD	0,29 to 0,77	Number of Specimens (N)	10 of 10
Obs Coef of Variation (CV)	6,1%		



Supporting Data

Analyst	DAL
Expt Date	11 nov 2021
Units	HbA1c (%)
Target Mean	--
Target CV	--
Control Lot	P&D 2021a exp 31 dez 2023
Reag Lot	P&D 2021a exp 31 dez 2023
Cal Lot	P&D 2021a exp 31 dez 2023
Comment	

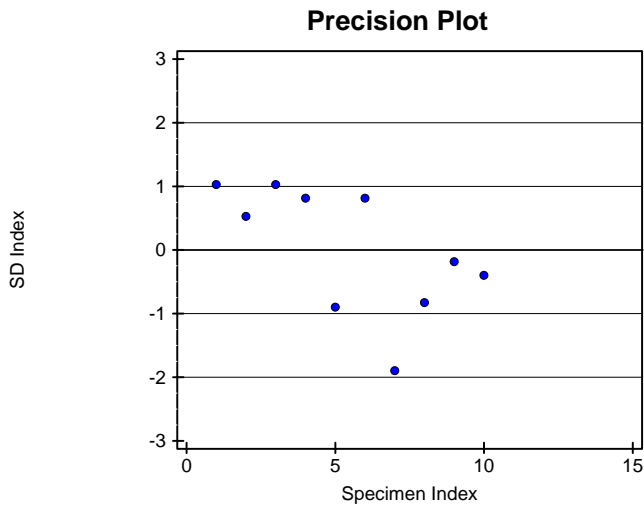
Precision Data

Index	Results	Index	Results	Index	Results	Index	Results
1	6,3	4	7,3	7	6,5	10	7,4
2	7,3	5	6,5	8	7		
3	7	6	6,5	9	7,3		

X: excluded from calculations

Avaliação da imprecisão da metodologia em valores mais altos - PREC3 (10,96%).

Precision Statistics			
Obs Mean	10,96 HbA1c (%)	95% CI for Obs Mean	9,96 to 11,96
Obs Standard Dev (SD)	1,40	Obs 2 SD Range	8,16 to 13,76
95% Confidence for Obs SD	0,96 to 2,56	Number of Specimens (N)	10 of 10
Obs Coef of Variation (CV)	12,8%		



Supporting Data

Analyst	DAL
Expt Date	11 nov 2021
Units	HbA1c (%)
Target Mean	--
Target CV	--
Control Lot	P&D 2021a exp 31 dez 2023
Reag Lot	P&D 2021a exp 31 dez 2023
Cal Lot	P&D 2021a exp 31 dez 2023
Comment	

Precision Data

Index	Results	Index	Results	Index	Results	Index	Results
1	12,4	4	12,1	7	8,3	10	10,4
2	11,7	5	9,7	8	9,8		
3	12,4	6	12,1	9	10,7		

X: excluded from calculations

ANEXO D – Ficha do aluno

21/11/2021 22:34

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação



Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
FICHA DO ALUNO

9142 - 10937042/1 - Débora Araújo de Lima

Email: debora.adlima@usp.br
Data de Nascimento: 07/11/1990
Cédula de Identidade: RG - 47305479-6 - SP
Local de Nascimento: Estado de São Paulo
Nacionalidade: Brasileira
Graduação: Bacharela em Biomedicina - Universidade de Santo Amaro - São Paulo - Brasil - 2014

Curso: Mestrado
Programa: Farmácia (Fisiopatologia e Toxicologia)
Área: Fisiopatologia
Data de Matrícula: 30/08/2018
Início da Contagem de Prazo: 30/08/2018
Data Limite para o Depósito: 25/11/2021
Orientador Acadêmico: Prof(a). Dr(a). Sandro Rogerio de Almeida - 30/08/2018 até 11/12/2018. Email: sandroal@usp.br
Orientador: Prof(a). Dr(a). Valdemir Melechco Carvalho - 12/12/2018 até o presente. Email: valdemir.carvalho@fleury.com.br
Proficiência em Línguas: Inglês, 30/08/2018
Data de Aprovação no Exame de Qualificação: Aprovado em 23/10/2019
Data do Depósito do Trabalho:
Título do Trabalho:
Data Máxima para Aprovação da Banca:
Data de Aprovação da Banca:
Data Máxima para Defesa:
Data da Defesa:
Resultado da Defesa:
Histórico de Ocorrências: Primeira Matrícula em 30/08/2018

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 6542 em vigor de 20/04/2013 até 28/03/2018).

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 19/07/2021

Impresso em: 21/11/2021 22:34:37



Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

FICHA DO ALUNO

9142 - 10937042/1 - Débora Araújo de Lima

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
MPT6005-2/1	Técnicas de Separação: Fundamentos e Aplicações (Instituto de Química - Universidade de São Paulo)	11/03/2019	05/05/2019	120	8	100	A	N	Concluída
FBC5793-14/2	Tópicos em Fisiopatologia e Toxicologia I	12/03/2019	24/06/2019	15	1	88	B	N	Concluída
FBC5757-8/3	Tópicos em Fisiopatologia e Toxicologia II	06/08/2019	18/11/2019	15	1	87	B	N	Concluída
QFL5727-4/1	Introdução à Espectrometria de Massas (Instituto de Química - Universidade de São Paulo)	15/08/2019	16/10/2019	90	6	100	B	N	Concluída
ICB5747-2/5	Ciências Ômicas em Doenças Infecciosas (CODI) (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	22/06/2020	12/07/2020	90	6	100	A	N	Concluída
MPT6003-3/1	Macromoléculas (Instituto de Química - Universidade de São Paulo)	19/10/2020	13/12/2020	120	0	-	-	N	Matrícula cancelada
PSP5121-2/1	Bioestatística (Faculdade de Saúde Pública - Universidade de São Paulo)	23/03/2021	31/05/2021	90	6	100	B	N	Concluída

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito da dissertação	
Disciplinas:	0	25	28
Estágios:			
Total:	0	25	28

Créditos Atribuídos à Dissertação: 71

Conceito a partir de 02/01/1997:

A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.

Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 19/07/2021

Impresso em: 21/11/2021 22:34:38

ANEXO E – CURRÍCULO LATTES



Debora Araujo de Lima



Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/2997153903691781>

ID Lattes: **2997153903691781**

Última atualização do currículo em 13/06/2021

Possui graduação em Biomedicina pela Universidade de Santo Amaro (2013) e mestranda pelo Programa de Pós Graduação em Farmácia pela Universidade de São Paulo. Atualmente é analista de laboratório na empresa Fleury Medicina e Saúde, onde atua com preparação de amostras e liberação de resultados pelas técnicas de cromatografia e espectrometria de massas com foco, principalmente, em proteômica direcionada. **(Texto informado pelo autor)**

Identificação

Nome	Debora Araujo de Lima 
Nome em citações bibliográficas	LIMA, D. A.
Lattes iD	 http://lattes.cnpq.br/2997153903691781

Endereço

Formação acadêmica/titulação

2018	Mestrado em andamento em Farmácia (Fisiopatologia e Toxicologia) (Conceito CAPES 7). Universidade de São Paulo, USP, Brasil. Título: Aplicação da proteômica dirigida na determinação da glicação A1c e fenotipagem de variantes de hemoglobina a partir da coleta de sangue em papel filtro, Orientador: Professor Doutor Valdemir Melechco Carvalho.
2010 - 2013	Graduação em Biomedicina. Universidade de Santo Amaro, UNISA, Brasil. Título: Avaliação do Marcador Tumoral CA 19-9 em cultura de células de adenocarcinoma pancreático utilizando a técnica de RNA de interferência para o gene HOXB7. Orientador: Profª Dra. Maria Regina Andrade de Azevedo.
2005 - 2008	Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, Brasil. Ensino Médio (2º grau). Madre Odette de Souza Carvalho, MOSC, Brasil.

Formação Complementar

Atuação Profissional

Fleury Medicina e Saúde, FLEURY, Brasil.

Vínculo institucional

2014 - Atual

Vínculo: Celetista, Enquadramento Funcional: Analista de Laboratório, Carga horária: 44

Áreas de atuação

1.

Evaluation of volumetric absorptive
microsampling and mass spectrometry data-
independent acquisition in hemoglobin related
clinical markers

*Debora A. Lima^{1,2}, Rodrigo A. Schuch², Jéssica S. Salgueiro¹, Maria Carolina T. Pintão²,
Valdemir M. Carvalho^{2,3*}.*

¹ Chromatography Division, ² Research and Development Division, Fleury Group, 04344-070, São Paulo, SP, Brazil. ³ Graduate Program in Pathophysiology and Toxicology, School of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil.

KEYWORDS. Data-independent acquisition, proteomics, volumetric absorptive microsampling, glycosylated hemoglobin, hemoglobin variants.

ABSTRACT

Data-independent acquisition (DIA) allows comprehensive proteome coverage, and it has the potential to work as a unified protocol to determine a multitude of proteins in blood. Because of its high specificity, mass spectrometry has a high potential to reduce the interferences presented by other assays in the evaluation of blood markers. Here, we combined DIA with volumetric absorptive microsampling (VAMS) and automated proteomics sample processing as a platform to perform clinical markers determination. We evaluate, as a proof-of-concept, two hemoglobin-related clinical biomarkers: glycated hemoglobin (HbA1c) and hemoglobin variants. HbA1c by DIA showed good correlation with the reference method, but method imprecision did not meet the very low imprecision specification for the clinical evaluation of this biomarker. A strategy for identification of Hb variants was developed based on a customized database combined with a workflow for DIA data extraction and rigorous evaluation of peptides. This approach revealed Hb variants not identified by routinely clinical methods such as Hb Woodville and Hb Okayama.

INTRODUCTION

The adoption of human blood proteome in clinical laboratory routine is highly expected given its potential to improve diagnosis by revealing new biomarkers and displaying physiological changes associated with diseases. Most of the development efforts have been devoted to the determination of mediators between tissues and products of tissue damage, which may be present in low concentrations in blood and poses challenges in the bioanalytical perspective ¹. Notwithstanding, proteome-derived technology can be applied in the improvement of classical blood biomarkers testing which have been used in clinical routine for years but processed by techniques that may present some shortcomings.

Hemoglobin is an abundant blood protein with numerous diagnostic purposes, such as the assessment of several types of anemia and long-term management of glycemia by the measurement of its glycosylated form, the HbA1c. Several analytical methods, such as ion exchange or affinity chromatography, electrophoresis, and immunoassays, can measure HbA1c. Automated HPLC methods are acknowledged as the gold standards for HbA1c determination and provide good precision. However, they are vulnerable to interferences from unstable and/or abnormal hemoglobin variants ². As the disagreement among those methods can be considerable, the International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (IFCC) promoted a network to standardize HbA1c determination. One of the reference methods is based on liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC-MS) ³. The reference method is targeted to quantify the N-terminal glycosylated and non-glycosylated hexapeptides of the hemoglobin beta chain and addressed to certify reference material rather than being applied in clinical laboratory practice.

Over 1300 Hb variants have been reported ^{4, 5} and the hemoglobinopathies are the most frequent hereditary condition affecting 7% of the world population ⁶. A multitude of approaches have been used for Hb variants identification, such as ion-exchange chromatography, capillary,

and gel electrophoresis, multiplex-ligation dependent probe amplification, PCR, and Gap-PCR, among others. Most of them can identify a certain number of Hb variants. Next-generation sequencing is the decisive procedure to encompass all variants in the globins genes and genetic modifiers implied in globin expression ⁷. However, those tests are costly and not commonly available.

Data-independent acquisition (DIA) acquires both full scan mass (MS) and tandem mass (MS/MS) spectra using sequential isolation and fragmentation of relatively large precursor windows to obtain complete precursor and fragment ion spectra throughout the chromatographic time range ⁸. DIA combined with targeted data extraction can confidently identify and quantify peptides with accuracies comparable with those obtained by selected reaction monitoring, the gold standard proteomic quantification method ⁹. Therefore, DIA based proteomics is comparable to the proteome digitalization since a wide range of protein features are captured and can be reinterrogated later.

Here, we applied volumetric absorptive microsampling (VAMS), which involves an easy sample collection procedure based on the absorption of precise volumes of blood onto a porous tip ¹⁰, with automated proteomics sample preparation ¹¹. To evaluate its applicability to clinical routine, two approaches related to Hb were evaluated: quantification of HbA1c and identification of Hb variants. Our approach was validated and compared with clinical laboratory reference methods.

MATERIALS AND METHODS

Materials

LC–MS grade water, acetonitrile, and formic acid (FA), HPLC grade acetic acid and dimethyl sulfoxide (DMSO), iodoacetamide, and TPCK-treated bovine trypsin were obtained from Sigma (St. Louis, MO, USA). LC-MS grade trifluoroacetic acid (TFA) and Pierce RT calibration mixture (PTRC) were purchased from Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA). Dithiothreitol (DTT), iodoacetamide (IAA) e ammonium bicarbonate (AmBic) were acquired from Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). Sera-Mag magnetic carboxylate-modified particles were from GE Healthcare (Little Chalfond, UK). and 10 μ L Mitra™ was ordered from Neoteryx® (Torrance, CA, USA). Ultrapure water was produced using the Elga Purelab Flex system (High Wycombe, UK).

Clinical samples

The Ethics Committee approved this study (Plataforma Brasil Certificate of Presentation for Ethical Consideration: 02241818.4.0000.5474). Paired venous and capillary whole-blood specimens were collected from volunteers after informed consent. Potassium EDTA venous blood de-identified specimens collected as part of standard HbA1c and Hb variants diagnostic protocols that would normally be discarded were also used in this investigation. Specimens were codified and only HbA1c levels or the type of Hb variant were recorded.

Capillary whole blood was obtained by finger prick using BD Microtainer Quickheel™ lancets (Becton Dickinson Vacutainer Systems, Franklin Lakes, NJ) and blood was collected straight into VAMS devices by placing the sampling tip to the blood drop and allowing the tip to turn entirely red. VAMS devices were allowed to air dry for 4 hours at room temperature and thus packed in sealed polypropylene bags containing silica desiccant sachets and kept at room

temperature for up to 7 days. Venous blood samples were drawn into BD Vacutainer tubes containing ethylenediaminetetraacetic acid as an anticoagulant. After homogenization by inverting, aliquots of 10 μ L were spotted on VAMS devices and processed as described for capillary blood.

Ninety-five blood specimens previously evaluated for HbA1c by the Bio-Rad D-100 HbA1c analyzer were included in this study. Thirty-six blood specimens previously evaluated for hemoglobinopathies were included in this study. The routine protocol for hemoglobinopathies characterization was based on capillary zone electrophoresis (CZE) followed by cation exchange high performance liquid chromatography (CEX-HPLC). CZM was achieved in Capillarys 2 Flex Piercing System (Sebia, Lisses, France) which includes automated processing for hemolysis, separation based on electrophoretic mobility and spectrophotometric detection at 415 nm. The identification of variants within defined zones was obtained using software Phoresis (version 9.3.0). CEX-HPLC was performed in Variant II Hemoglobin Testing System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) equipped with β -Thalassemia Short Program kit and controlled by CDM 5.1.1 software.

Sample Preparation

VAMS tips were transferred to an empty Mitra 96-Autorack™, and the rack was placed into a 96 deep-well polypropylene plate (Eppendorf, Germany) containing 250 μ L ammonium bicarbonate (20 mM) with 0.5% deoxycholic acid. Proteins were extracted by incubation in a thermomixer (Eppendorf) at 1000 rpm and 37 °C for 40 minutes, VAMS tips were removed and protein extracts were stored at -80 °C until further processing. An automated magnetic bead-based sample preparation method adapted from a previously described protocol was used for protein reduction, alkylation, and tryptic digestion¹¹. Following steps of sample preparation were implemented on a Hamilton Robotics Microlab STARlet liquid handling system

(Hamilton Company, Reno, NV, USA) equipped with eight pipetting channels, a labware gripper, and an automated heater shaker. Programming and operation were achieved using Hamilton Robotics Venus Three software. Fifty microliters of protein extract were transferred to a Protein LoBind 96-deep-well plate followed by dispensing of 50 μL of Sera-Mag carboxyl-modified magnetic particles suspension in water at 1 mg/mL. Samples were reduced with the addition of 10 μL of 10 mM DTT, followed by incubation at 65 °C and 1000 rpm for 15 min. Ten microliters of 10 mM IA were dispensed, and the mixture was kept at room temperature for 15 minutes for alkylation. One volume of ethanol was then dispensed into the plate and the mixture was agitated at 900 rpm for 5 min. The plate was transferred to a Magnum EX Universal Magnet Plate (Alpaqua, Beverly, MA, USA) for 5 min where the supernatant was discarded. The immobilized beads were rinsed once with 800 μL of 80% ethanol and twice with 200 μL of 80% ethanol. A solution of TPCK-treated trypsin (75 μL at 65 $\mu\text{g}/\text{mL}$) in 50 mM AmBic was dispensed, and the plate was incubated at 37 °C, 1000 rpm for 2 h. Tryptic digests were acidified by the addition of 5 μL of 10% TFA in water, followed by short mixing. Beads were immobilized on a magnetic rack and tryptic digests were transferred to a Protein LoBind Deepwell plate 96/500 μL and PRTC was dispensed in each well calibration mixture at a final concentration of 50 fmol/ μL . The target plate was removed from the robotic liquid handler, heat-sealed with pierceable foil sheets, and kept at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ until analysis by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS).

LC-MS/MS Analyses

All MS analyses were performed on an UltiMate 3000 Nano LC system connected to a Q-Exactive HF-X mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany) equipped with an EASY-Spray source operating in positive ion mode. The chromatographer was fitted with a PepMap100 C18 5 μm , 0.3 \times 5 mm sample trapping pre-column and a PepMap RSLC

C18 2 μm , 150 $\mu\text{m} \times 15$ cm analytical column (Thermo Fisher Scientific). Two microliters of tryptic extracts were injected using the function microliter pickup using 0.1% TFA as transport liquid, loaded into the LC system using 0.1% TFA at 100 $\mu\text{L}/\text{min}$, and trapped for 2 min. For chromatographic separation, the flow rate was 1.2 $\mu\text{L}/\text{min}$, and the column was kept at 45 $^{\circ}\text{C}$; solvent A was 1% DMSO, 0.1% formic acid in LC/MS grade water and B was 1% DMSO, 0.1% formic acid in acetonitrile. A 20-min linear gradient was used as follows: 6% B for 4 minutes, 6-20% B for 15 min, 20-85% B for 2 min. Source parameters were set as follows: spray voltage = 2.2 kV, capillary temperature = 275 $^{\circ}\text{C}$, and S-lens RF level = 50. The signal at m/z 401.92272 from DMSO was used as a lock mass. Xcalibur software (version 4.2.47, Thermo Fisher Scientific) was used for instrument control data acquisition.

Data-dependent acquisition (DDA) was performed comprising the acquisition of a full scan mass spectrum from m/z 350 to 1650 at 120,000 mass resolution (at m/z 200), automatic gain control (AGC) set to $3e6$ with a maximum injection time (maxIT) of 60 ms. The top 15 most abundant peaks corresponding to double to six charged ions were selected for MS/MS. The MS/MS spectra were acquired with 15,000 mass resolution (at $m/z = 200$), an isolation window of m/z 1.6, AGC set to 2×10^5 with a maxIT of 60 ms. Higher-energy collisional dissociation (HCD) was achieved with nitrogen as the collision gas and normalized collision energy (NCE) of 30%. Dynamic exclusion was applied for 20 s and isotope detection was enabled to exclude all isotopes from a cluster.

DIA experiments were performed alternating one full scan from m/z 360 to 900 at 60,000 mass resolution followed by 16 MS/MS scans with 25 m/z precursor isolation windows, at 15,000 resolution, AGC target $5e^5$, maxIT 55 ms with NCE of 30%. Isolation window placements were optimized by Skyline and covered from m/z 350 to 800 using an overlapping window of 0.5 m/z .

Data processing: quantification of HbA1c

For quantitative HbA1c determinations, hemoglobin beta N-terminal non-glycated (VHLTPEEK) and glycated peptides (glyc-VHLTPEEK) were quantified by the sum of its integrated chromatographic precursor and fragment ion peak areas. N-terminal non-glycated (VHLTPEEK) was set as surrogate standard in Skyline for establishing glycation. Raw data were imported and processed into Skyline with no transformation (i.e., smoothing) and peak integration was reviewed individually. Quantification was carried out employing a calibration curve with the following concentration points: 4.8, 5.9, 6.8, 8.0, 9.0, 10.5, 12.6 and 15.2 %HbA1c (29.3, 40.9, 50.6, 64.0, 75.0, 91.8, 114.5 and 142.6 mmol/mol). Regression fit was adjusted to linear, no normalization method was set, no regression weighting, and MS1 and MS2 were evaluated separately. Two quality control samples with concentrations of 5.6 and 9.7 %HbA1c (38.0 and 83.0 mmol/mol) were included in each run. If the control material failed to provide the required results, the run was rejected.

Data processing: identification of hemoglobin variants

DDA raw data was converted into mzML format using msConvert (ProteoWizard)¹² and analyzed through Trans-Proteomic Pipeline¹³. Data were searched against UniProtKB/Swiss-Prot human reviewed database (downloaded on November, 2021) with added decoy sequences using Comet. Search criteria included carbamidomethylation of cysteine as a fixed modification, oxidation of methionine, and N-terminal protein glycation as variable modifications, trypsin digestion allowing one missed cleavage, and mass tolerance for the precursor mass error was 5 ppm. Results were then processed by PeptideProphet and iProphet using a probability of 0.99. The combined interact.pep.xml was used to build the capillary

whole blood spectral library by BiblioSpec at Skyline ¹⁴. The empirical spectral library contained 1210 precursor entries.

A hemoglobin variant FASTA database was produced with sequences of hemoglobin subunits alpha (P69905), beta (P68871), delta (P02042), gamma 1 (P69891), gamma 2 (P69892), and the natural variants for subunits alpha and beta described at Uniprot Swissprot Human database. All protein sequences were imported into Skyline to predict tryptic peptides using the following settings: one missed trypsin digestion cleavage, minimum 6 residues, maximum 40 residues, and N-terminal protein glycation as variable modification. Repeated peptides were excluded in order to keep only hemoglobin alpha and beta full sequences, whereas variants contained only theoretical tryptic peptides containing amino acid variation. Prosit ¹⁵ integrated into Skyline was used to predict MS2 spectra for those peptides not included in the empirical spectral library. Precursor ions with 1 to 3 charges were enabled and for HCD spectra prediction, a normalized collision energy of 30% was set. Prosit was also used for retention times prediction using HBA and HBB tryptic peptides as iRT peptides.

DIA raw data were imported and processed directly in Skyline. Precursor peptides were selected from 2 to 4 charges and filtered with 4 isotope peaks. Fragment transitions were automatically chosen from library 5 most intense ions and 1 missed trypsin cleavage was allowed. Retention time prediction was enabled using Prosit prediction calculator with time window of 3 minutes. The ion match tolerance was set to 0.05 m/z with peak areas restricted to only y and b-type fragment ions. The data were manually reviewed to ensure correct peak detection and integration.

Method validation

Method precision was estimated by testing 3 patient whole blood pools at low, medium and high HbA1c concentration levels. Samples were analyzed in duplicate for 5 consecutive days. Total imprecisions were calculated by EP Evaluator precision module 12 (Data Innovations; South Burlington, VT). Linearity was evaluated by testing 10 concentrations (varying from 4.4 to 14.4 %HbA1c) produced by mixing high patient pool diluted with a low patient pool and tested in triplicate. Slopes and intercepts were determined using EP Evaluator linearity module. Limit of quantitation was estimated by analyzing 5 samples with low concentrations over 10 days and calculated by EP Evaluator based on a projection of the lowest concentration resulting in a CV < 20%. Method comparisons were performed using de-identified clinical specimens previously tested by NGSP-certified Bio-Rad D-100 HbA1c analyzer. Paired results were analyzed by applying the alternate (quantitative) method comparison module in EP Evaluator using Deming regression to estimate slope, intercept, correlation coefficient (R), bias, and percent bias (%).

The stability study used venous and capillary whole blood spotted on VAMS devices stored at room temperature for 0, 3 and 10 days. All conditions were tested in biological triplicates in the same run by randomized LC-MS/MS acquisitions. Differences between each condition and controls stored in sealed plastic bags with desiccant at -80 °C on the same day of spotting were evaluated with independent 2-group two-sided t-tests ($\alpha=0.05$).

RESULTS AND DISCUSSION

Protein extraction from VAMS and automated proteomics processing

To evaluate protein extraction efficiency from VAMS tips the following variables were investigated: concentration of deoxycholic acid and time in the thermomixer at 1000 rpm and 37 °C. The combination of 0.5% deoxycholic acid for 40 minutes showed to be efficient (data not shown). After VAMS tips removal, we obtained a final volume of 50 µL protein extract. Sample coordinates were exported to the robotic liquid handler, which performed all remaining steps.

Proteomics automated processing was implemented by modifying a previously developed protocol by our group¹¹. Protein extracts were transferred to another microplate, combined with magnetic beads and sequentially submitted to reduction and alkylation, followed by ethanol precipitation and washings removed reagents. One of the most important bottlenecks in proteomics sample preparation protocols, the digestion step, was optimized and reduced to 4 h with no loss in sensitivity to the hemoglobin peptides.

Evaluation of HbA1c quantitative performance based on VAMS and MS data - independent acquisition

Trypsin digestion of beta hemoglobin chains resulted in the generation of N-terminal octapeptides: VHLTPEEK and glyc-VHLTPEEK (Figure 1). N-terminal non-glycated (VHLTPEEK) was set as surrogate standard in Skyline for establishing glycation based on a linear regression obtained from a calibration curve. The IFCC reference method³ is based on endoproteinase Glu-C digestion, which results in a hexapeptide, and mass spectrometric detection is based on the precursor ion at unit resolution. Here, we evaluated high resolution

mass detection at MS1 by combining signals from 4 isotopologues and at MS2 combining 4 product ions. MS2 detection provided better linear correlation coefficients (data not shown).

Fifty specimens previously evaluated by NGSP-certified automated HbA1c CEX-HPLC analyzer and with HbA1c concentrations uniformly distributed over the clinical HbA1c interval were used to evaluate method accuracy. Twenty-four specimens were used to establish concentrations for a 10 points calibration curve produced by diluting high HbA1c concentration patient pool diluted with a low concentration pool. The NGSP-adjusted in house calibration curve was used to quantify the remaining 26 specimens. Deming regression yielded a slope of 0.948, y-intercept of 0.3 and -1.22% of bias (Figure 2). The assay is linear over the measured range, assessed from 4.8 to 16.0 %HbA1c (29.0 to 151.0 mmol/mol). The limit of quantitation is 4.2 %HbA1c, the lowest HbA1c concentration assayed.

For the evaluation of HbA1c quantitation precision, we evaluated three HbA1c levels with means concentrations of 5.0, 6.9 and 11.0% HbA1c (30.9, 52.0 and 93.3 mmol/mol) and coefficient of variation ranged from 6.1 to 12.8% (Table 1). As HbA1c assays used for diagnosis should achieve an imprecision of <3% CV¹⁶, this method does not meet HbA1c requirements for clinical routine. The IFCC reference method³ which is design to meet very low CVs, is based on a similar strategy, i.e., the determination of N-terminal β -chain peptides after enzymatic digestion. While IFCC reference method is based on endoproteinase Glu-C digestion which results in a hexapeptide, here we used trypsin which produces octapeptide. IFCC method sample processing requires erythrocyte isolation, resulting in a much simpler matrix than whole blood. Henderson and collaborators¹⁷ evaluated HbA1c on dried blood spots followed by a targeted parallel reaction monitoring method and also verified imprecisions over 10%.

One source of variability could be associated with HbA1c stability in VAMS devices. Analyzing devices stored at room temperature for 3 and 10 days compared to those kept

refrigerated on the day of collection, we detected a significant increase in glycation for both capillary and venous blood (Table 2). Despite some analytes were reported to present stability on VAMS after 2 months at room temperature¹⁸, we found progress of glycation in the dry matrix indicating that HbA1c stability is an issue on whole blood dry matrix. Verougstraete and colleagues explored the feasibility of HbA1c monitoring with VAMS sampling at home and analysis in the laboratory by CEX-HPLC. They observed higher agreement with standardized venous blood when VAMS samples were analyzed within 1 to 3 days compared to those analyzed within 4 to 6 days, but even analyzing within 3 days did not provide results meeting the desirable performance standards¹⁹.

To further investigate sample stability in VAMS, we evaluated the stability of individual Hb alpha and beta peptides (Table 3). While VHLTPEEK is stable over the whole interval evaluated, glyc-VHLTPEEK is not. The instability seems to be a specific limitation of glycosylated peptides since other evaluated peptides showed stability up to 3 days at room temperature, and most of them up to 10 days of non-refrigerated storage.

Identification of hemoglobin variants

Inherited hemoglobin disorders can be classified into two groups: thalassemias, which are caused by impaired synthesis of globin, and hemoglobinopathies caused by structural disorders. Diagnosis is a complex process based on the combination of previous clinical information with a multitude of different laboratory tests. Routine analysis includes classic hematological parameters such as complete blood count, hemoglobin levels and red blood cell morphology are the initial indicators of hemoglobin related disorders²⁰. CEX-HPLC and CZE are the most used techniques for hemoglobinopathy identification and present advantages, such as automated sample preparation from the patient test tube. These techniques analyze Hb native tetrameric structure and can separate the expected predominant Hb form (Hb A, $\alpha_2\beta_2$) which

responds for over 95% in adults, from minority forms such as Hb A₂ ($\alpha_2\delta_2$) and of Hb F ($\alpha_2\gamma_2$). Additional chromatographic or electrophoretic peaks may indicate hemoglobin variants and quantification of the tetramers is important for the diagnosis of thalassemia. Hb detection is achieved by spectrophotometric detection at 415 nm and identification on based the predicted retention times on defined regions on the chromatogram or electropherogram. Therefore, these techniques are convenient for clinical routine, but not necessarily unequivocal since they lack selectivity.

Molecular analysis of the globin genes (*HBA1*, *HBA2* and *HBB*) can contribute to the diagnosis of hemoglobin disease. However, the high homology of *HBA1* and *HBA2*, the great number of variations and the heterogeneity of type and location can be a challenge ^{21,22}. In a series of 208 consecutive patients with laboratory evidence of beta-thalassemia that were analyzed in our institution, 6.7% had no molecular variation detected by conventional Sanger sequencing ²³. The numbers can vary according to the study however, detecting the cause of hemoglobinopathy is still a challenge. Therefore, an alternative approach that could contribute to the investigation is of great value.

Different approaches based on mass spectrometry have been proposed to identify of hemoglobin variants ²⁴. Direct analysis of intact globin polypeptide chains by top down proteomics allows simple sample preparation. However, MS/MS spectral interpretation is challenging and even common Hb variants such as Hb C and Hb D are difficult to identify when to normal Hb is present ²⁵. Targeted proteomics methods have also been described based on bottom-up²⁶ and top-down²⁷ approaches. Targeted proteomics are very sensitive and selective, but limited to a few selected molecular targets.

As numerous Hb variants were described ⁴, DIA-based proteomics seems to be one a promising alternative to complement hemoglobinopathy diagnoses. One of the major

challenges in implementing DIA-based methods is computational deconvolution of the multiplexed fragmented spectra acquired²⁸. We used Skyline¹⁴ not only to provide data deconvolution but also in several steps of method development. We create a variant database with 420 entries corresponding to all natural variants described at UniProt²⁹ for chains α and β using (UniProt accessions P69905 and P68871) (Supplementary material). Also, we built an experimental spectral library from whole blood DDA data (Figure 3). In order to increase sequence coverages for α and β chain up to one missed cleavage was allowed for some peptides, resulting in 100% sequence coverage for α and 96 % α for β chain. For the predicted peptides for variants, Prosit¹⁵ was used to build a spectral library and retention time calculator. Enabling Prosit NCE calibration at 30% we verified good agreement between experimental and predicted dissociation spectra (Figure 4) showing that predicted spectral libraries could confirm peptide identification.

As hemoglobinopathies include qualitative and quantitative changes in the globin chains, a single workflow to verify a globin sequence variation, or abnormal globin synthesis pattern as those observed in thalassemias, it is difficult to establish. Notwithstanding, after analyzing 36 hemoglobinopathy specimens, we propose a script for reviewing data imported and deconvoluted at Skyline (Figure 5). Skyline provides a convenient interface for inspecting peptide parameters across many samples.

Figure 6 illustrates the process of identification of the variant Hasharon (UniProt HBAVAR002765). Examining peak areas replicate comparison, it is possible to observe a decrease in the peak area for peptide TYFPHFDLSHGSAQVK. Verification of the individual peptide peak areas replicate comparison plot confirmed this finding, since peptide intensity is reduced compared with the wild pool samples and other variants analyzed in the same batch. Looking for the expected variant peptides for the hemoglobin subunit alpha variants in the sequence position from 40 to 59, we observe double and triple charged precursor ions with mass

errors less than 2 ppm corresponding to TYFPHFHLSHGSAQVK. The variant peptide is further confirmed by precursor ions isotope dot products (0.99 and 0.98, respectively for double and triple charge predicted precursor ions), Prosit-predicted product ions dot product (0.97 and 0.91) and retention time close to the predicted by retention time calculated by Prosit. The detected peptide, TYFPHFHLSHGSAQVK, corresponding to D to H substitution at position 48, which indicates the variant Hasharon ³⁰.

Another example is illustrated in the Figure 7. Hovering over Skyline peak areas replicate comparison plot, it is observable a relative decrease in peak area for peptide EFTPPVQAAYQK in specimen 51. Looking for the expected variant peptides for the hemoglobin subunit beta variants in the sequence position from 120 to 131 we observed the detection of the double charged precursor and product ions corresponding to QFTPPVQAAYQK. The variant peptide is further confirmed by precursor ion with mass errors less than 2 ppm, high isotope dot product (0.99), Prosit-predicted product ions dot product (0.98) and retention time close to the predicted by retention time calculated by Prosit. The detected peptide, QFTPPVQAAYQK, indicated the variant Hb D E122Q (also known as D-Los Angeles, D-Punjab, D-Portugal, D-Chicago or D-Oak Ridge) ³¹.

Thirty-six hemoglobinopathies specimens previously analyzed by CZE/CEX-HPLC were included in this study and twenty-three agreed between both methods (Table 4). The DIA-based proteomics approach (Supplementary Figures 1 and 2) characterized specimens of unidentified samples by CZE/CEX-HPLC such as the rare variants Woodville (Supp. Figure 1) and Okayama (Supp. Figure 2).

Das and colleagues³², developed an approach based on MS^E, which is a data-independent acquisition but at MS1 since there is no precursor windows selection, therefore less selective and dependent on the match by a proprietary software processing (ProteinLynx). In addition, this method is based on a 60 minutes nanochromatography-based analysis and sample

preparation is manual and requires blood cells separation and washings. We base our method on a more robust 30 min microchromatography-based acquisition and fully automated sample preparation from dried whole blood immobilized on VAMS. One strength of the proposed approach is the combination of several qualifiers to curate and confirm a sequence variant, such as inspection in the wild sequences and the validation of the detection of predicted peptides by dot products and agreement with predicted retention times.

CONCLUSIONS

This study reports on the development of a new method for determination of whole blood protein markers based on volumetric absorptive microsampling followed by automated sample preparation and DIA-based proteomics acquisition. We evaluated two distinct applications: the quantitative determination of glycosylated hemoglobin and the identification of hemoglobin variants. For HbA1c determination, we found imprecisions ranging from 6 to 12%, unacceptable for this specific clinical marker. We proposed an approach for hemoglobin variant identification based on a customized hemoglobin database combined with a workflow for DIA data extraction and rigorous evaluation of peptides, including multiple qualifiers. This approach revealed Hb variants not identified by routinely clinical methods such as Hb Woodville and Hb Okayama. As our method requires tiny volumes of blood, VAMS is very suitable for home sampling and conditions where blood volume is limited. Combining VAMS with a fully automated proteomics sample preparation method makes it more scalable and amenable to daily clinical laboratory routine. The DIA comprehensive acquisition method could enable the determination of multiple clinical markers. As few methodologies have demonstrated clinical applicability of DIA, quantitative and qualitative results presented here provide additional information about its strength and deficiencies for clinical routine.

ASSOCIATED CONTENT

Information. Supplementary_material.pdf.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*Correspondence to Valdemir Melechco Carvalho (valdemir.carvalho@grupofleury.com.br).

Author Contributions

V.M. Carvalho conceived the study and wrote the original draft of the manuscript. D.A. Lima and V.M. Carvalho designed experiments. D.A. Lima and V.M. Carvalho performed the experiments. D.A. Lima, V.M. Carvalho, J.S. Salgueiro and M.C.T. Pintão analyzed data. R.A. Schuch developed automated sample preparation. M.C.T. Pintão interpreted clinical data from hemoglobin variants. R.A. Schuch and M.C.T. Pintão critically revised the manuscript. All authors have given approval to the final version of the manuscript.

Funding Sources

This study was supported by the Fleury Group.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGMENT

The authors thank Karina H. M. Cardozo, Luciana G. Viana, Andrea T. Faccio, Milena G. T. Bezerra and Pedro Saddi for fruitful discussions.; Simone A. M. Zillig, Claudia Y. Kamei and Jonathan Wachtel for their contributions with hemoglobin measurements and sample selection.

ABBREVIATIONS

DIA, Data-independent acquisition; VAMS, volumetric absorptive microsampling; HbA1c, glycated hemoglobin; IFCC, International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine; LC-MS, liquid chromatography coupled to mass spectrometry; MS/MS, tandem mass; CZE, capillary zone electrophoresis; CEX-HPLC, cation exchange high performance liquid chromatography.

REFERENCES

(Word Style “TF_References_Section”). References are placed at the end of the manuscript.

Authors are responsible for the accuracy and completeness of all references. Examples of the recommended format for the various reference types can be found at

<http://pubs.acs.org/page/4authors/index.html>. Detailed information on reference style can be found in *The ACS Style Guide*, available from Oxford Press.

- (1) Anderson, N. L.; Anderson, N. G. The human plasma proteome: history, character, and diagnostic prospects. *Mol Cell Proteomics* **2002**, *1* (11), 845-867. DOI: 10.1074/mcp.r200007-mcp200. Rifai, N.; Gillette, M. A.; Carr, S. A. Protein biomarker discovery and validation: the long and uncertain path to clinical utility. *Nat Biotechnol* **2006**, *24* (8), 971-983. DOI: 10.1038/nbt1235.
- (2) Carta, M.; Dall'Olio, G.; Soffiati, G. Determination of HbA1c in the presence of haemoglobin variants: comparison of three HPLC techniques. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* **1997**, *35* (12), 923-925. Khoo, H. M.; Robinson, C. A.; Goolsby, K.; Hardy, R. W.; Konrad, R. J. Evaluation of a fully automated high-performance liquid chromatography assay for hemoglobin A1c. *Arch Pathol Lab Med* **1999**, *123* (9), 763-767. DOI: 10.5858/1999-123-0763-EOFAH. Weykamp, C. W.; Penders, T. J.; Siebelder, C. W.; Muskiet, F. A.; van der Slik, W. Interference of carbamylated and acetylated hemoglobins in assays of glycohemoglobin by HPLC, electrophoresis, affinity chromatography, and enzyme immunoassay. *Clin Chem* **1993**, *39* (1), 138-142.
- (3) Jeppsson, J. O.; Kobold, U.; Barr, J.; Finke, A.; Hoelzel, W.; Hoshino, T.; Miedema, K.; Mosca, A.; Mauri, P.; Paroni, R.; et al. Approved IFCC reference method for the measurement of HbA1c in human blood. *Clin Chem Lab Med* **2002**, *40* (1), 78-89. DOI: 10.1515/CCLM.2002.016.
- (4) Giardine, B.; Borg, J.; Viennas, E.; Pavlidis, C.; Moradkhani, K.; Joly, P.; Bartsakoulia, M.; Riemer, C.; Miller, W.; Tzimas, G.; et al. Updates of the HbVar database of human hemoglobin variants and thalassemia mutations. *Nucleic Acids Res* **2014**, *42* (Database issue), D1063-1069. DOI: 10.1093/nar/gkt911.
- (5) Giardine, B.; van Baal, S.; Kaimakis, P.; Riemer, C.; Miller, W.; Samara, M.; Kollia, P.; Anagnou, N. P.; Chui, D. H.; Wajcman, H.; et al. HbVar database of human hemoglobin variants and thalassemia mutations: 2007 update. *Hum Mutat* **2007**, *28* (2), 206. DOI: 10.1002/humu.9479.
- (6) Davies, S. C.; Cronin, E.; Gill, M.; Greengross, P.; Hickman, M.; Normand, C. Screening for sickle cell disease and thalassaemia: a systematic review with supplementary research. *Health Technol Assess* **2000**, *4* (3), i-v, 1-99.
- (7) Shang, X.; Peng, Z.; Ye, Y.; Asan; Zhang, X.; Chen, Y.; Zhu, B.; Cai, W.; Chen, S.; Cai, R.; et al. Rapid Targeted Next-Generation Sequencing Platform for Molecular Screening and Clinical Genotyping in Subjects with Hemoglobinopathies. *EBioMedicine* **2017**, *23*, 150-159. DOI: 10.1016/j.ebiom.2017.08.015.
- (8) Venable, J. D.; Dong, M. Q.; Wohlschlegel, J.; Dillin, A.; Yates, J. R. Automated approach for quantitative analysis of complex peptide mixtures from tandem mass spectra. *Nat Methods* **2004**, *1* (1), 39-45. DOI: 10.1038/nmeth705.
- (9) Gillet, L. C.; Navarro, P.; Tate, S.; Röst, H.; Selevsek, N.; Reiter, L.; Bonner, R.; Aebersold, R. Targeted data extraction of the MS/MS spectra generated by data-independent acquisition: a new concept for consistent and accurate proteome analysis. *Mol Cell Proteomics* **2012**, *11* (6), O111.016717. DOI: 10.1074/mcp.O111.016717.

- (10) Denniff, P.; Spooner, N. Volumetric absorptive microsampling: a dried sample collection technique for quantitative bioanalysis. *Anal Chem* **2014**, *86* (16), 8489-8495. DOI: 10.1021/ac5022562.
- (11) Cardozo, K. H. M.; Lebkuchen, A.; Okai, G. G.; Schuch, R. A.; Viana, L. G.; Olive, A. N.; Lazari, C. D. S.; Fraga, A. M.; Granato, C. F. H.; Pintão, M. C. T.; et al. Establishing a mass spectrometry-based system for rapid detection of SARS-CoV-2 in large clinical sample cohorts. *Nat Commun* **2020**, *11* (1), 6201. DOI: 10.1038/s41467-020-19925-0.
- (12) Chambers, M. C.; Maclean, B.; Burke, R.; Amodei, D.; Ruderman, D. L.; Neumann, S.; Gatto, L.; Fischer, B.; Pratt, B.; Egertson, J.; et al. A cross-platform toolkit for mass spectrometry and proteomics. *Nat Biotechnol* **2012**, *30* (10), 918-920. DOI: 10.1038/nbt.2377.
- (13) Deutsch, E. W.; Mendoza, L.; Shteynberg, D.; Farrah, T.; Lam, H.; Tasman, N.; Sun, Z.; Nilsson, E.; Pratt, B.; Prazan, B.; et al. A guided tour of the Trans-Proteomic Pipeline. *Proteomics* **2010**, *10* (6), 1150-1159. DOI: 10.1002/pmic.200900375.
- (14) Pino, L. K.; Searle, B. C.; Bollinger, J. G.; Nunn, B.; MacLean, B.; MacCoss, M. J. The Skyline ecosystem: Informatics for quantitative mass spectrometry proteomics. *Mass Spectrom Rev* **2017**. DOI: 10.1002/mas.21540.
- (15) Gessulat, S.; Schmidt, T.; Zolg, D. P.; Samaras, P.; Schnatbaum, K.; Zerweck, J.; Knaute, T.; Rechenberger, J.; Delanghe, B.; Huhmer, A.; et al. Prosit: proteome-wide prediction of peptide tandem mass spectra by deep learning. *Nat Methods* **2019**, *16* (6), 509-518. DOI: 10.1038/s41592-019-0426-7.
- (16) Sacks, D. B.; Arnold, M.; Bakris, G. L.; Bruns, D. E.; Horvath, A. R.; Kirkman, M. S.; Lernmark, A.; Metzger, B. E.; Nathan, D. M. Guidelines and recommendations for laboratory analysis in the diagnosis and management of diabetes mellitus. *Clin Chem* **2011**, *57* (6), e1-e47. DOI: 10.1373/clinchem.2010.161596.
- (17) Henderson, C. M.; Bollinger, J. G.; Becker, J. O.; Wallace, J. M.; Laha, T. J.; MacCoss, M. J.; Hoofnagle, A. N. Quantification by nano liquid chromatography parallel reaction monitoring mass spectrometry of human apolipoprotein A-I, apolipoprotein B, and hemoglobin A1c in dried blood spots. *Proteomics Clin Appl* **2017**, *11* (7-8). DOI: 10.1002/prca.201600103.
- (18) Mandrioli, R.; Mercolini, L.; Protti, M. Blood and Plasma Volumetric Absorptive Microsampling (VAMS) Coupled to LC-MS/MS for the Forensic Assessment of Cocaine Consumption. *Molecules* **2020**, *25* (5). DOI: 10.3390/molecules25051046.
- (19) Verougstraete, N.; Lapauw, B.; Van Aken, S.; Delanghe, J.; Stove, C.; Stove, V. Volumetric absorptive microsampling at home as an alternative tool for the monitoring of HbA1c in diabetes patients. *Clin Chem Lab Med* **2017**, *55* (3), 462-469. DOI: 10.1515/cclm-2016-0411.
- (20) Kutlar, F. Diagnostic approach to hemoglobinopathies. *Hemoglobin* **2007**, *31* (2), 243-250. DOI: 10.1080/03630260701297071.
- (21) Farashi, S.; Harteveld, C. L. Molecular basis of α -thalassemia. *Blood Cells Mol Dis* **2018**, *70*, 43-53. DOI: 10.1016/j.bcmd.2017.09.004.
- (22) Thein, S. L. Molecular basis of β thalassemia and potential therapeutic targets. *Blood Cells Mol Dis* **2018**, *70*, 54-65. DOI: 10.1016/j.bcmd.2017.06.001.
- (23) Lavelle, N. C. Molecular Basis and Diagnostic aspects of Alpha and Beta Thalassemias in Brazil. . Universidade Federal de São Paulo., São Paulo, 2019.
- (24) Zanella-Cleon, I.; Joly, P.; Becchi, M.; Francina, A. Phenotype determination of hemoglobinopathies by mass spectrometry. *Clin Biochem* **2009**, *42* (18), 1807-1817. DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2009.04.010.
- (25) Rai, D. K.; Landin, B.; Alvelius, G.; Griffiths, W. J. Electrospray tandem mass spectrometry of intact beta-chain hemoglobin variants. *Anal Chem* **2002**, *74* (9), 2097-2102. DOI: 10.1021/ac011068f.
- (26) Helmich, F.; van Dongen, J. L.; Kuijper, P. H.; Scharnhorst, V.; Brunsveld, L.; Broeren, M. A. Rapid phenotype hemoglobin screening by high-resolution mass spectrometry on intact proteins. *Clin Chim Acta* **2016**, *460*, 220-226. DOI: 10.1016/j.cca.2016.07.006.

- (27) Lassout, O.; Hartmer, R.; Jabs, W.; Clerici, L.; Tsybin, Y. O.; Samii, K.; Vuilleumier, N.; Hochstrasser, D.; Scherl, A.; Lescuyer, P.; et al. Clinical method evaluation of hemoglobin S and C identification by top-down selected reaction monitoring and electron transfer dissociation. *Clin Proteomics* **2019**, *16*, 41. DOI: 10.1186/s12014-019-9261-1.
- (28) Zhang, F.; Ge, W.; Ruan, G.; Cai, X.; Guo, T. Data-Independent Acquisition Mass Spectrometry-Based Proteomics and Software Tools: A Glimpse in 2020. *Proteomics* **2020**, *20* (17-18), e1900276. DOI: 10.1002/pmic.201900276.
- (29) Consortium, U. UniProt: the universal protein knowledgebase in 2021. *Nucleic Acids Res* **2021**, *49* (D1), D480-D489. DOI: 10.1093/nar/gkaa1100.
- (30) Charache, S.; Mondzac, A. M.; Gessner, U. Hemoglobin Hasharon (alpha-2-47 his(CD5)beta-2): a hemoglobin found in low concentration. *J Clin Invest* **1969**, *48* (5), 834-847. DOI: 10.1172/JCI106041.
- (31) LEHMANN, H. Three varieties of human haemoglobin D. *Nature* **1958**, *182* (4639), 852-854. DOI: 10.1038/182852a0.
- (32) Das, R.; Mitra, G.; Mathew, B.; Ross, C.; Bhat, V.; Mandal, A. K. Automated analysis of hemoglobin variants using nanoLC-MS and customized databases. *J Proteome Res* **2013**, *12* (7), 3215-3222. DOI: 10.1021/pr4000625.

Figures and Tables

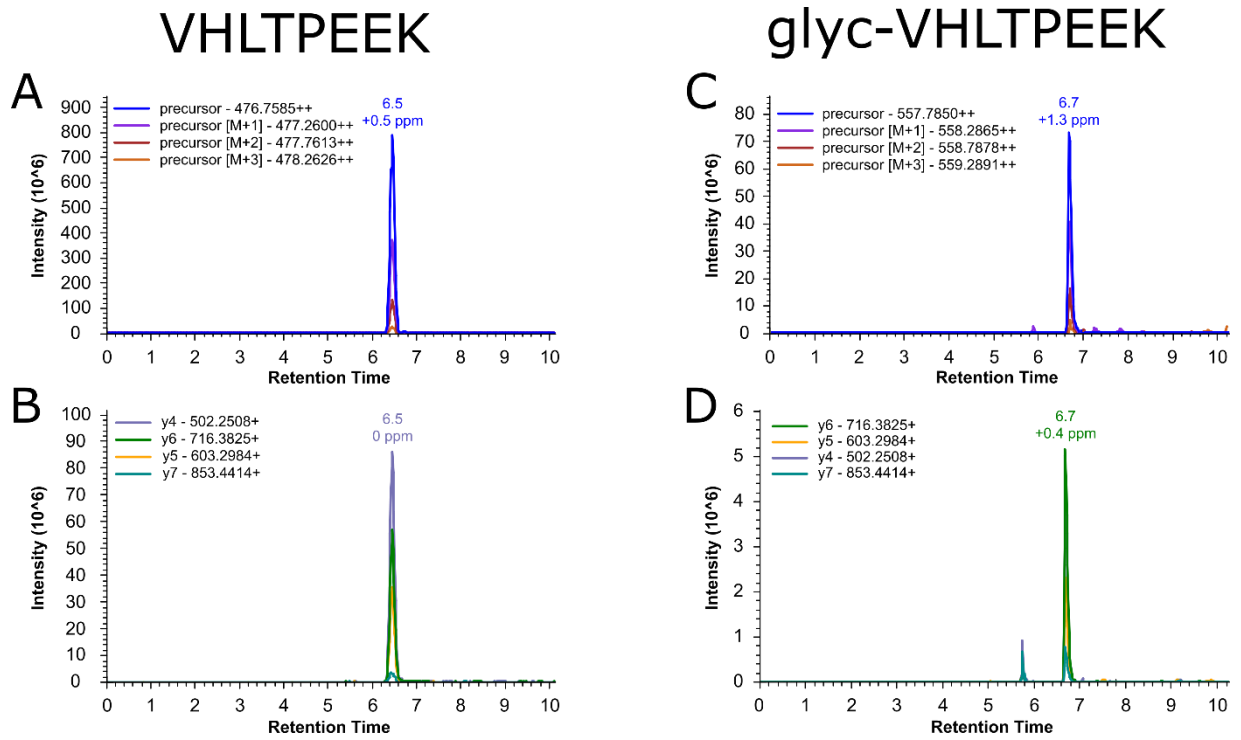


Figure 1: Data-independent acquisition extracted chromatograms corresponding to mass-to-charge coordinates of beta hemoglobin N-terminal tryptic peptides. A: non glycosylated peptide precursor ions; B: non glycosylated peptide product ions; C: glycosylated peptide precursor ions; D: glycosylated peptide product ions.

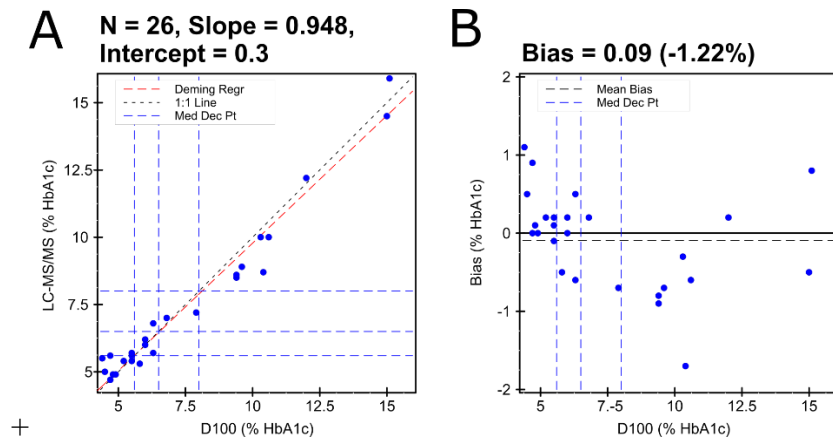


Figure 2. A. Deming regression (A) and bias plots (B) of HbA1c determination by VAMS-DIA LC-MS/MS compared to the reference method (CX-HPLC).

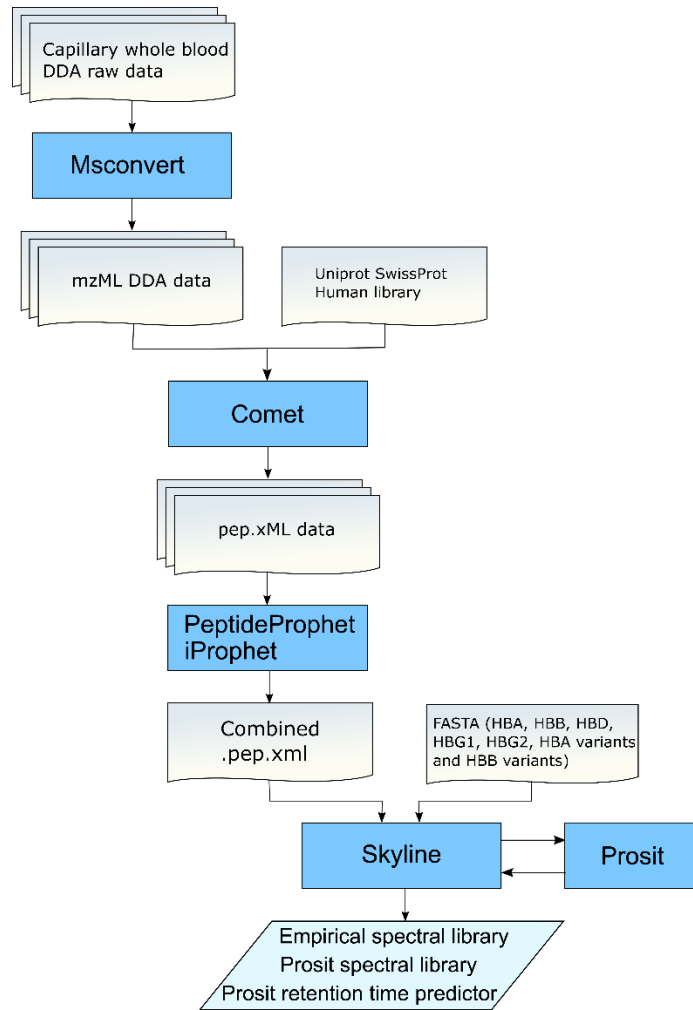


Figure 3: Workflow for the development of the DIA-based identification of hemoglobin variants.

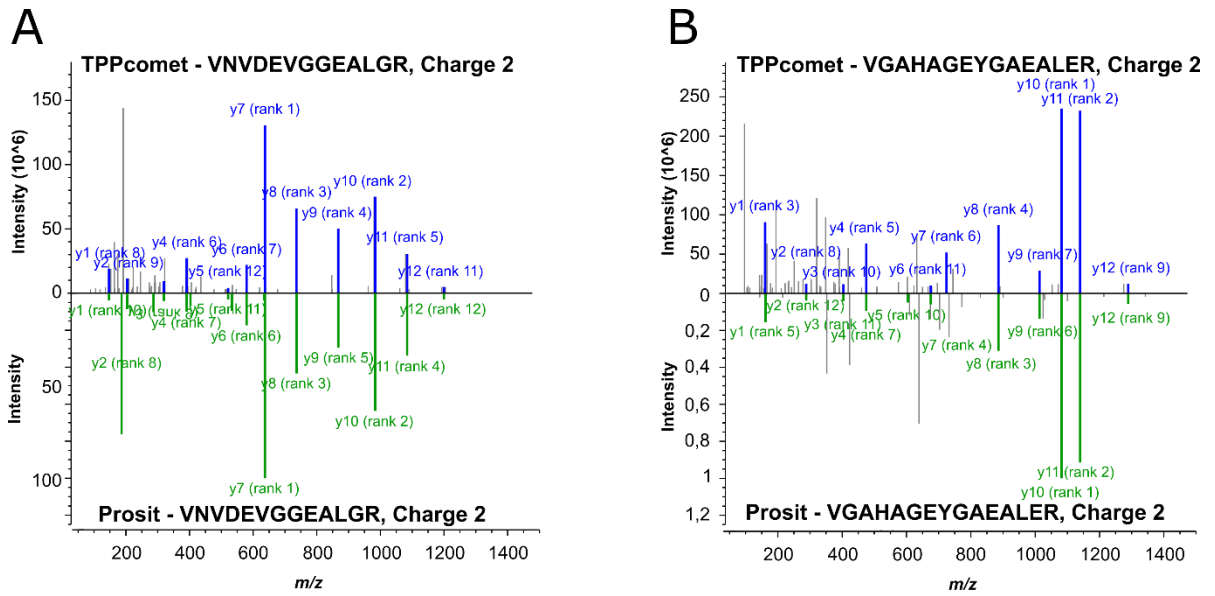


Figure 4: Comparison between experimental (TPPcomet) and predicted (Prosit) MS2 spectra.

A: HBB (VNVDEVGGEALGR, double charged, NCE = 30). B: HBA (VGAHAGEYGAEALER, double charged, NCE = 30).

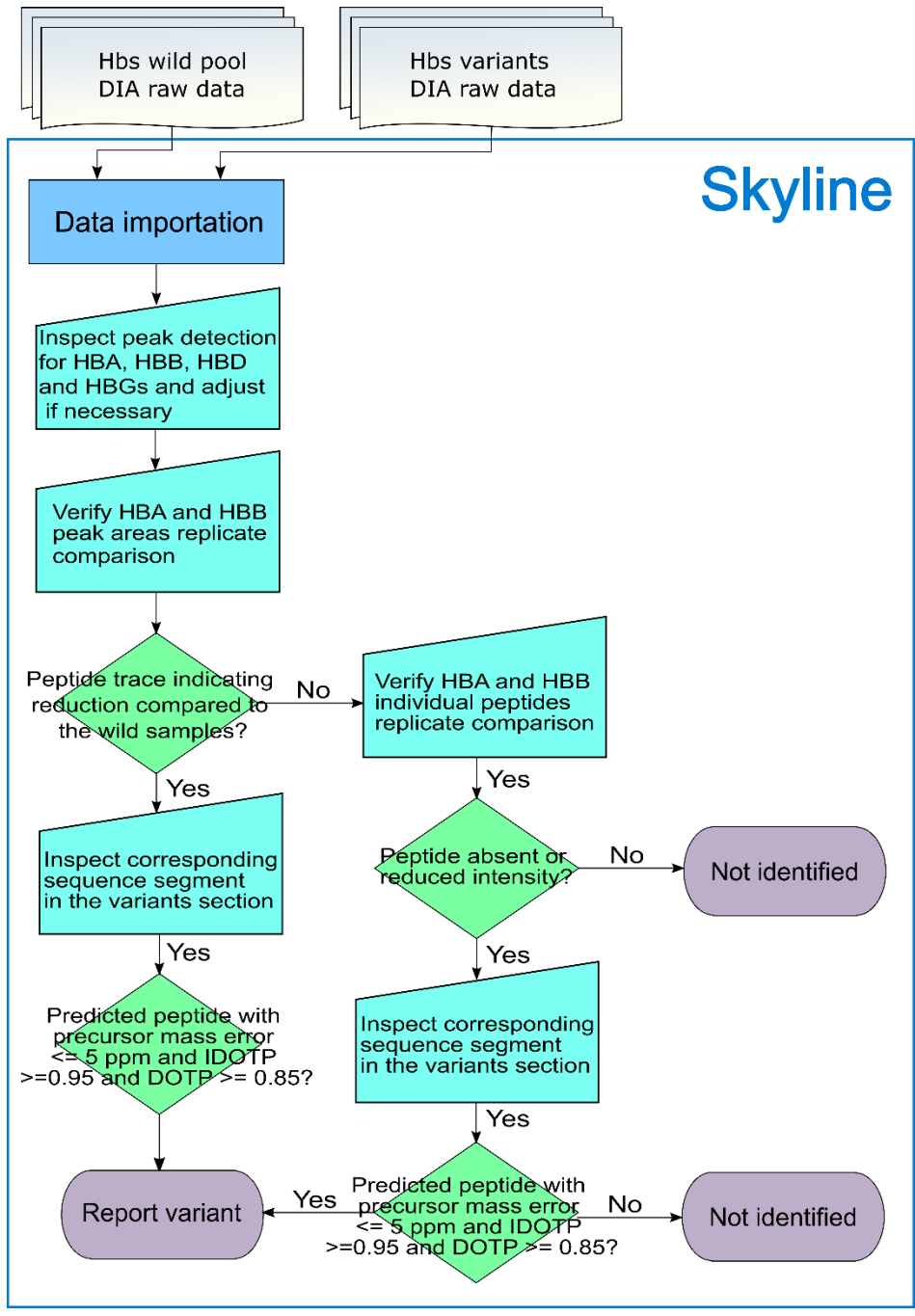


Figure 5: Workflow for DIA data interpretation on analysis of variants using Skyline.

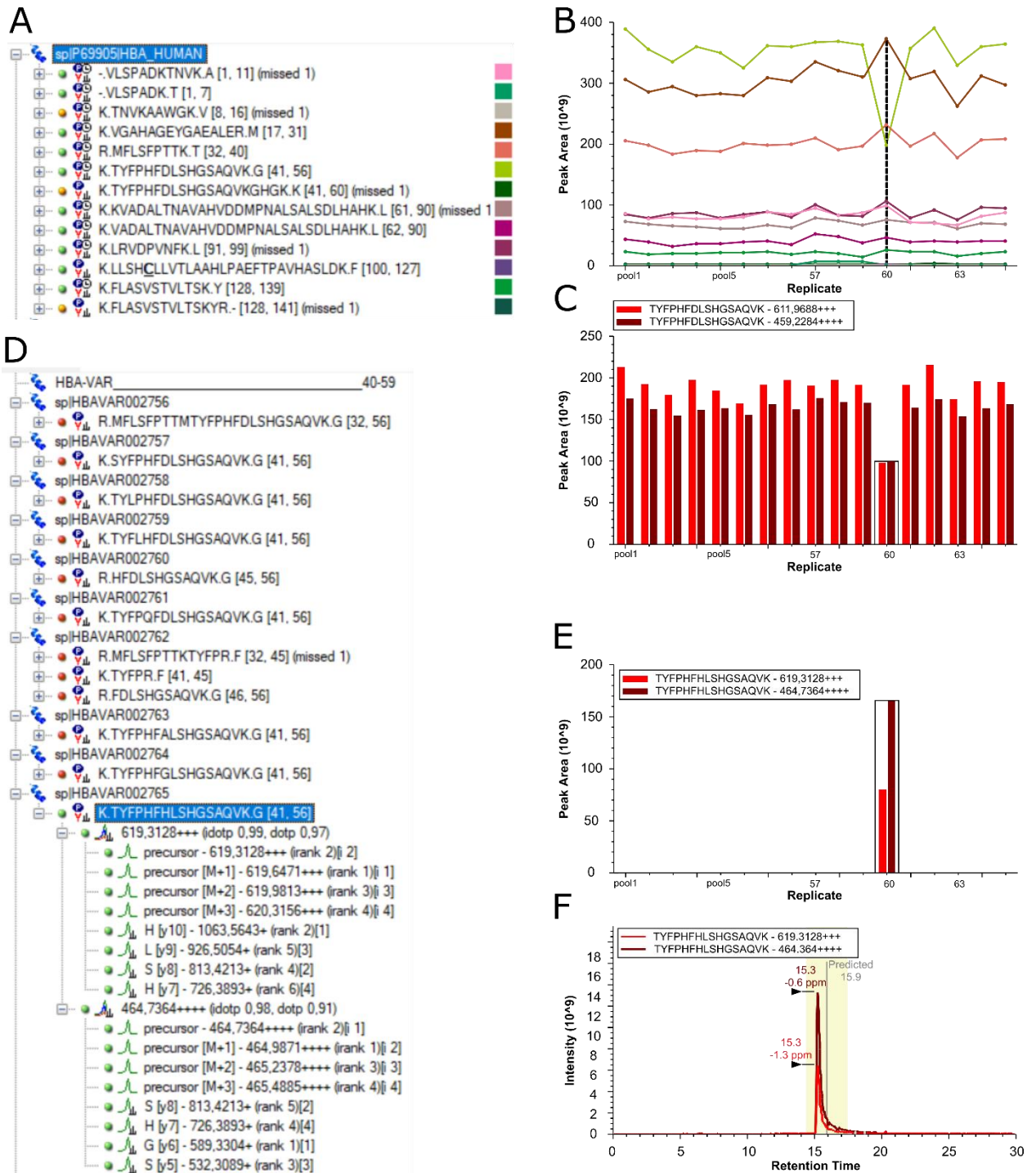


Figure 6: Identification of the variant Hasharon (UniProt HBAVAR002765). A: Hemoglobin subunit alpha (HBA_HUMAN) tryptic peptides. B: Skyline peak areas replicate comparison plot depicting relative decrease in peak area for peptide TYFPHFDSLHGSAQVK. C: Skyline individual peptide peak areas replicate comparison plot depicting relative decrease in peak area for peptide TYFPHFDSLHGSAQVK in specimen 60. D: Hemoglobin subunit alpha variants

(detail from variants in the sequence position from 40 to 59. E: Skyline individual peptide peak areas replicate comparison plot depicting the detection of the double and triple charged precursor ions peptide corresponding to TYFPHFHLSHGSAQVK. F: Data independent acquisition extracted chromatograms for the predicted double and triple charged precursor and product ions corresponding to TYFPHFHLSHGSAQVK.

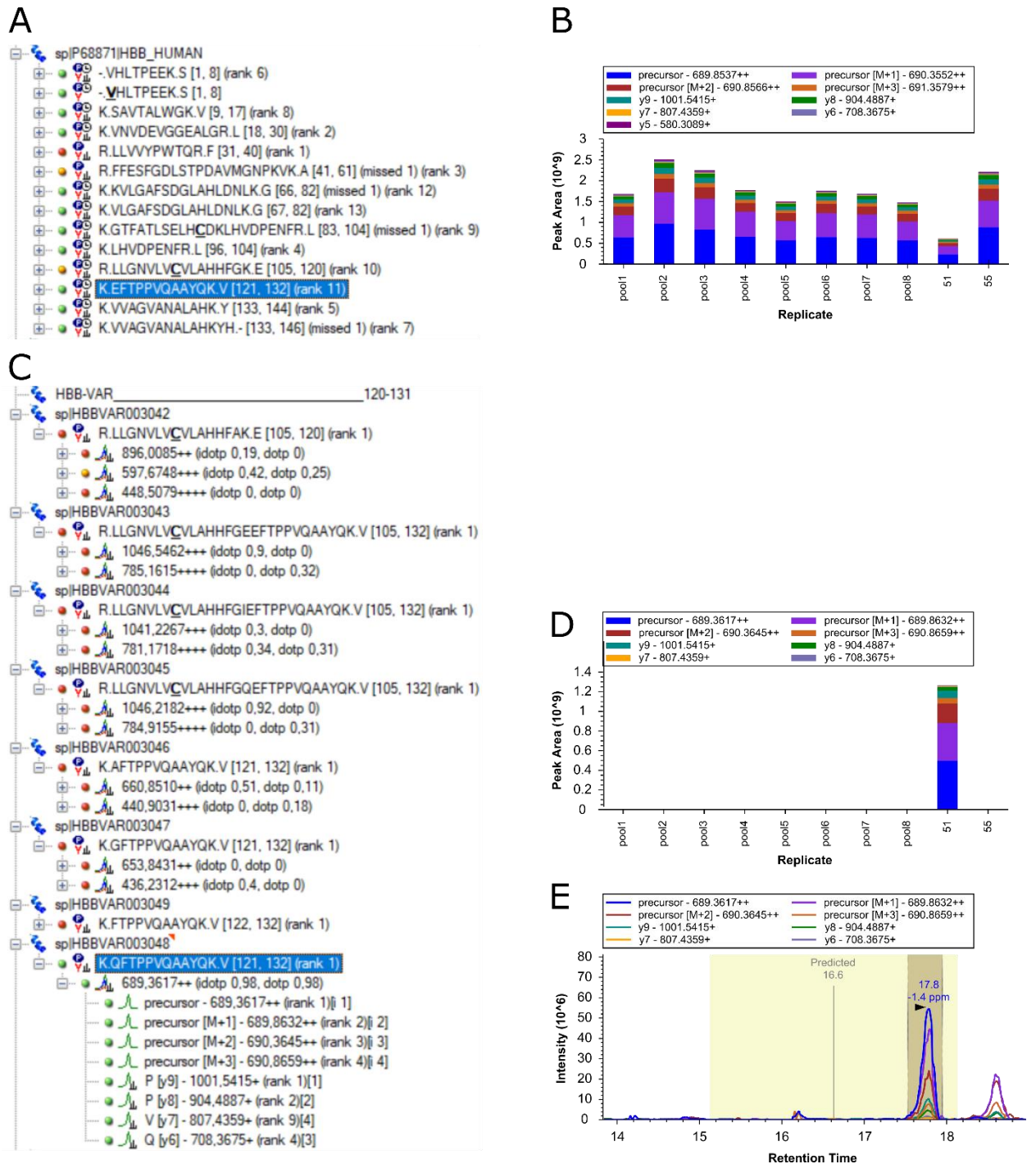


Figure 7: Identification of the variant D-Los Angeles/D-Punjab/D-Portugal/D-Chicago/D-Oak Ridge (UniProt HBBVAR_003048). A: Skyline peak areas replicate comparison plot depicting relative decrease in peak area for peptide EFTPPVQAAYQK. B: Skyline individual peptide peak areas replicate comparison plot depicting relative decrease in peak area for peptide EFTPPVQAAYQK in specimen 51. C: Hemoglobin subunit beta variants (detail from variants in the sequence position from 120 to 131). D: Skyline individual peptide peak areas replicate

comparison plot depicting the detection of the double charged precursor and product ions corresponding to QFTPPVQAAYQK. F: Data independent acquisition extracted chromatograms for the predicted double and triple charged precursor and product ions corresponding to QFTPPVQAAYQK.

Table 1. Precision Results.

HbA1c level	Mean	Imprecision	
	%HbA1c (mmol/mol)	SD	%CV
Low	5.0 (30.9)	0.3	6.6
Medium	6.9 (52.0)	0.4	6.1
High	11.0 (93.3)	1.4	12.8

Samples were analyzed in duplicate for 5 consecutive days.

Table 2. HbA1c stability in volumetric absorption microsampling devices kept at room temperature.

Time (days) at room temperature	Capillary blood		Venous blood	
	average value ^a	p value ^b	average value ^a	p value ^b
	Control	5.3		5.5
3 days	5.7	0.020	6.1	0.005
10 days	6.2	0.002	6.9	0.002

^a %HbA1c. ^b bicaudal t-test compared to control (samples refrigerated in the same day of blood collection).

Table 3. Hemoglobin alpha and beta peptides stability in volumetric absorption microsampling devices kept at room temperature.

Peptide	Capillary		Venous	
	3 days	10 days	3 days	10 days
HBA_HUMAN VGAHAGEYGAEALER	0.813	0.737	0.772	0.335
HBA_HUMAN TYFPFDLSHGSAQVK	0.769	0.952	0.524	0.193
HBA_HUMAN				
VADALTNAVAHVDDMPNALSALS DL HAHK	0.453	0.012	0.472	0.012
HBA_HUMAN VDPVNFK	0.972	0.383	0.556	0.863
HBB_HUMAN VHLTPEEK	0.893	0.451	0.165	0.459
HBB_HUMAN glyc-VHLTPEEK	0.054	0.011	0.021	0.041
HBB_HUMAN VNVDEVGGEALGR	0.798	0.256	0.945	0.586
HBB_HUMAN VVAGVANALAHK	0.413	0.180	0.875	0.021

P values were calculated from total peptide peak areas compared to control (samples refrigerated in the same day of blood collection).

Table 4: Comparison between hemoglobin variants identification by capillary zone electrophoresis followed by cation exchange liquid chromatography and liquid chromatography coupled with DIA-based tandem mass spectrometry.

CZE/CX-HPLC	Number of samples	LC-MS/MS
HB S	9	Confirmed (HBBVAR002863)
HB C	6	Confirmed (HBBVAR002864)
HB D (D-Los Angeles/D-Punjab)	5	Confirmed (HBBVAR003048)
HB S homozygote	4	Confirmed (HBBVAR002863)
Hasharon/Sinai	2	Confirmed (HBAVAR002765)
Hope	1	Confirmed (HBBVAR003075)
Not identified	2	HB S (HBBVAR002863)
Not identified	1	Okayama (HBBVAR002858)
Not identified	1	Woodville (HBAVAR002727)
Camden	1	Camden peptide not detected
Lepore	1	Not identified (HBA VLSPADK elevated)
Not identified	1	Not identified (β chain elevated)
Not identified	1	Not identified (HBA VLSPADK and HBB VLSPADKTNVK elevated)

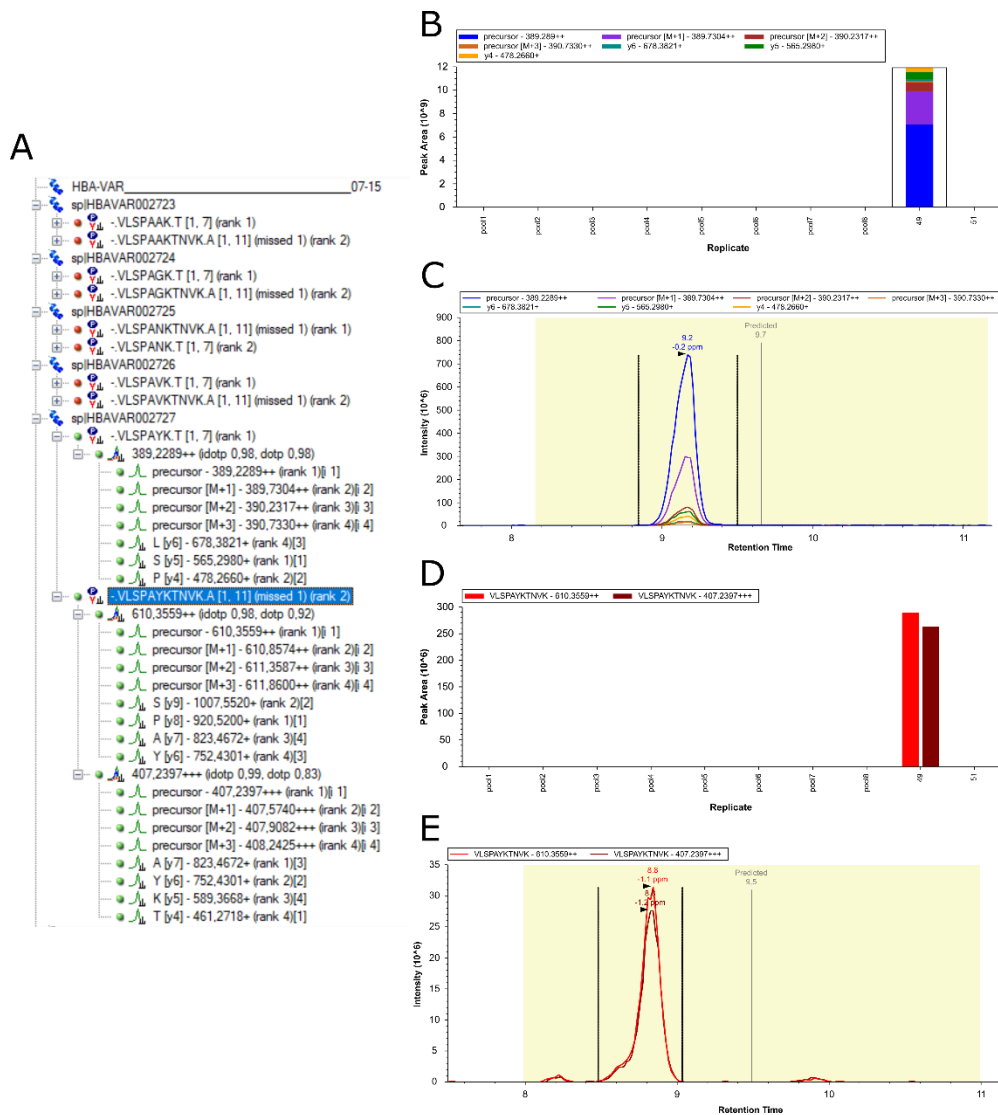
Not identified

1

Not identified (HBA VLSPADK elevated)

Evaluation of volumetric absorptive microsampling and
mass spectrometry data-independent acquisition in
hemoglobin related clinical markers

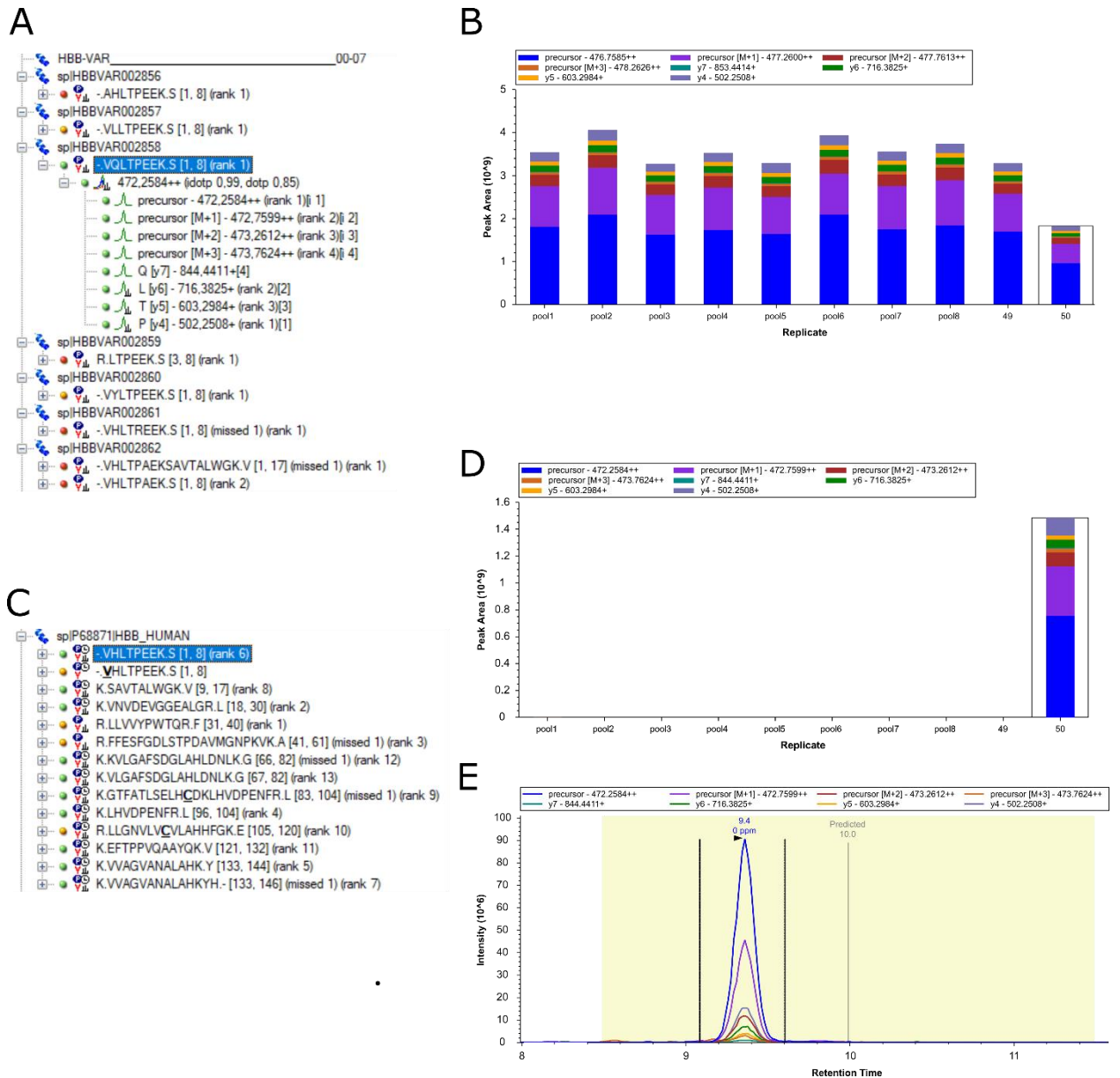
Supplementary material



Supplementary Figure 1: Identification of the variant Woodville (UniProt HBAVAR002727).

A: Hemoglobin subunit alpha variants (detail from variants in the sequence position from 1 to 7). B: Skyline individual peptide peak areas replicate comparison plot depicting the detection of the double charged precursor ions peptide corresponding to VLSPAYK in specimen 49. C: Data independent acquisition extracted chromatograms for the predicted double charged precursor and product ions corresponding to VLSPAYK. D: Skyline individual peptide peak areas replicate comparison plot depicting the detection of the double and triple charged precursor ions peptide corresponding to the missed cleavage VLSPAYKTNVK product. E: Data independent acquisition extracted chromatograms for the predicted double and triple

charged precursor and product ions corresponding to the missed cleavage VLSPAYKTNVK product.



Supplementary Figure 2: Identification of the variant Okayama (HBBVAR002858). A: Hemoglobin subunit beta variants (detail from variants in the sequence position from 1 to 8). B: Skyline peak areas replicate comparison plot depicting relative decrease in peak area for peptide VHLTPEEK. C: Hemoglobin subunit beta variants (detail from variants in the sequence position from 1 to 8). D: Skyline individual peptide peak areas replicate comparison plot depicting the detection of the double charged precursor and product ions corresponding to VQLTPEEK. E: Data independent acquisition extracted chromatograms for the predicted double charged precursor and product ions corresponding to VQLTPEEK.

Table 1. HBA and HBB variants database and template for Skyline.

```
>sp|HBAVAR
-----
>HBA-VAR 07-15
Hemoglobin subunit alpha variants position 7 to 15 [7, 15]
>sp|HBAVAR002723 Sawara; O(2) affinity up. dbSNP:rs33986902
VLSPAAKTNVKA
>sp|HBAVAR002724 Swan River. dbSNP:rs281864805
VLSPAGKTNVKA
>sp|HBAVAR002725 Dunn; O(2) affinity up. dbSNP:rs33961916
VLSPANKTNVKA
>sp|HBAVAR002726 Ferndown; O(2) affinity up. dbSNP:rs281864805
VLSPAVKTNVKA
>sp|HBAVAR002727 Woodville; O(2) affinity up. dbSNP:rs281864806
VLSPAYKTNVKA
>sp|HBAVAR002728 Kurosaki. dbSNP:rs34817956
VLSPADETNVKA
>sp|HBAVAR038149 Broomfield. dbSNP:rs281860608
VLSPADKTTVKAAGKV
>sp|HBAVAR002729 Anantharaj. dbSNP:rs33938574
KTNVEAAWGV
>sp|HBAVAR002730 J-Paris 1/J-Aljezur. dbSNP:rs35615982
KTNVKDAWGV
>sp|HBAVAR038150 Ravenscourt Park; causes alpha-thalassemia. dbSNP:rs35331909
KTNVKAPWGV
>sp|HBAVAR002731 Evanston; O(2) affinity up. dbSNP:rs33964317
RGKVGAHAGEYGAEALERM
>HBA-VAR 16-30
Hemoglobin subunit alpha variants position 16 to 30 [16, 30]
>sp|HBAVAR002732 Ottawa/Siam. dbSNP:rs35816645
KTNVKAARW
>sp|HBAVAR002733 Harbin; slightly unstable. dbSNP:rs35210126
KAAWGMVGAHAGEYGAEALERM
>sp|HBAVAR002734 Beijing. Corresponds to >VARIANTS dbSNP:rs281860648 and
dbSNP:rs281860619
KAAWGNVGAHAGEYGAEALERM
>sp|HBAVAR002735 Al-Ain Abu Dhabi. dbSNP:rs35993097
KVDHAGEYGAEALERM
>sp|HBAVAR002736 Handsworth. dbSNP:rs34504387
RAHAGEYGAEALERM
>sp|HBAVAR002737 J-Kurosh.
KVGDHAGEYGAEALERM
>sp|HBAVAR002738 J-Tashikuergan. dbSNP:rs35628685
KVGHEHAGEYGAEALERM
>sp|HBAVAR002739 Le Lamentin. dbSNP:rs41525149
KVGQAAGEYGAEALERM
>sp|HBAVAR002740 Hobart. dbSNP:rs33943087
RAGEYGAEALERM
>sp|HBAVAR002741 J-Nyanza. dbSNP:rs11548605
KVGADHGEYGAEALERM
>sp|HBAVAR002742 Fontainebleau. dbSNP:rs34324664
KVGHPGEYGAEALERM
>sp|HBAVAR002743 J-Medellin. dbSNP:rs34608326
KVGHADEYGAEALERM
>sp|HBAVAR002744 Reims; slightly unstable. dbSNP:rs33939421
KVGHAAGGYGAEALERM
>sp|HBAVAR002745 Chad. dbSNP:rs281864819
KAAWGKVGAGAGKY
>sp|HBAVAR002746 Luxembourg; unstable. dbSNP:rs281864821
KVGHAAGEHGAEALERM
>sp|HBAVAR002747 Shenyang; unstable. dbSNP:rs281864822
KVGHAAGEYGEEALERM
>sp|HBAVAR025387 Campinas. dbSNP:rs281864822
KVGHAAGEYGVAEALERM
```

```

>sp|HBAVAR002748 Hekinan. dbSNP:rs281865556
KVG AHAGEYGADALERM
>sp|HBAVAR002749 Fort Worth. dbSNP:rs281864823
KVG AHAGEYGAGALERM
>sp|HBAVAR002750 Spanish town. dbSNP:rs281864823
KVG AHAGEYGAVALERM
>sp|HBAVAR
Hemoglobin subunit alpha variants position 31 to 39 [31, 39]
>sp|HBAVAR002751 O-Padova. dbSNP:rs111033605
KVG AHAGEYGAEALKR
>sp|HBAVAR025002 Causes alpha-thalassemia. dbSNP:rs281864543
KVG AHAGEYGAEALEKM
>sp|HBAVAR002752 Prato; unstable. dbSNP:rs111033606
KVG AHAGEYGAEALESMFLSFPTTKT
>sp|HBAVAR002753 Queens/Ogi. dbSNP:rs281864825
RMFRSFPTTKT
>sp|HBAVAR002755 Catonsville.
RMFLSFPTTKT
>sp|HBAVAR002754 Bourmedes. dbSNP:rs281864826
RMFLSFRTTKT
>sp|HBAVAR
Hemoglobin subunit alpha variants position 40 to 59 [40, 59]
>sp|HBAVAR002756 Kanagawa; O(2) affinity up. dbSNP:rs281864828
RMFLSFPTTMTYFPHFDLSHGSAQVKG
>sp|HBAVAR002757 Miyano; O(2) affinity up. dbSNP:rs281860623
KSYFPHFDLSHGSAQVKG
>sp|HBAVAR002758 Hirosaki; unstable. dbSNP:rs41491146
KTYLPHFDLSHGSAQVKG
>sp|HBAVAR002759 Milledgeville; O(2) affinity up. Corresponds to >VARiants
dbSNP:rs33978134 and dbSNP:rs281864830
KTYFLHFDLSHGSAQVKG
>sp|HBAVAR002760 Kawachi; O(2) affinity up. dbSNP:rs281864830
RHF DLSHGSAQVKG
>sp|HBAVAR002761 Bari. dbSNP:rs281860624
KTYFPQFDLSHGSAQVKG
>sp|HBAVAR002762 Fort de France; O(2) affinity up. dbSNP:rs281864831
RMFLSFPTTKTYFPRF
>sp|HBAVAR002763 Cordele; unstable. dbSNP:rs281864833
KTYFPHFALSHGSAQVKG
>sp|HBAVAR002764 Kokura; also Umi/Michigan; unstable. dbSNP:rs281864833
KTYFPHFGLSHGSAQVKG
>sp|HBAVAR002765 Hasharon/Sinai; unstable. dbSNP:rs281864834
KTYFPHFHLSHGSAQVKG
>sp|HBAVAR002766 Kurdistan. dbSNP:rs281864834
KTYFPHFYLSHGSAQVKG
>sp|HBAVAR002767 Montgomery. dbSNP:rs41392146
KTYFPHFDRSHGSAQVKG
>sp|HBAVAR002768 Sa>VARia. dbSNP:rs41518249
KTYFPHFDLRHGSAQVKG
>sp|HBAVAR002769 Aichi; slightly unstable. dbSNP:rs281864835
KTYFPHFDLSRGSQVKG
>sp|HBAVAR002770 J-Abidjan. dbSNP:rs281864836
KTYFPHFDLSHDSAQVKG
>sp|HBAVAR002771 Russ. dbSNP:rs281864837
KTYFPHFDLSHRSAQVKGHGKK
>sp|HBAVAR002772 J-Rovigo; unstable. dbSNP:rs281864838
KTYFPHFDLSHGSDQVKG
>sp|HBAVAR002773 Hikoshima/Shimonoseki. dbSNP:rs281864839
KTYFPHFDLSHG SARV
>sp|HBAVAR002774 Port Huron. dbSNP:rs281864841
KTYFPHFDLSHGSAQVRG
>sp|HBAVAR002775 Thailand. dbSNP:rs281864841
KTYFPHFDLSHGSAQVTGHGKK
>sp|HBAVAR025388 Boghe. dbSNP:rs41378349
KTYFPHFDLSHGSAQVKGQGKK
>sp|HBAVAR002777 M-Boston/M-Osaka; O(2) affinity down. dbSNP:rs281864845

```

KTYFPHFDLSHGSAQVKGYGKK

>sp|HBAVAR

60-89

Hemoglobin subunit alpha variants position 60 to 89 [60, 89]

>sp|HBAVAR002778 Adana; unstable; causes alpha-thalassemia. dbSNP:rs28928878

KTYFPHFDLSHGSAQVKGHDKK

>sp|HBAVAR002780 Zambia. Corresponds to >VARIants dbSNP:rs281860659 and dbSNP:rs111033598Ensembl

KTYFPHFDLSHGSAQVKGHGKVK

>sp|HBAVAR002782 J-Buda. dbSNP:rs33985574

KNVADALTNAVAHVDDMPNALSALSDDLHAAHKL

>sp|HBAVAR002783 J-Anatolia. dbSNP:rs281865558

KTVADALTNAVAHVDDMPNALSALSDDLHAAHKL

>sp|HBAVAR002784 Evans; unstable. dbSNP:rs41515649

KMDALTNVAHVDDMPNALSALSDDLHAAHKL

>sp|HBAVAR066401 HBH; hemoglobin Aghia Sophia.

KADALTNVAHVDDMPNALSALSDDLHAAHKL

>sp|HBAVAR002785 Pontoise; unstable. dbSNP:rs34502246

KVDDALTNVAHVDDMPNALSALSDDLHAAHKL

>sp|HBAVAR002786 Persepolis. dbSNP:rs33984024

KVAYALTNVAHVDDMPNALSALSDDLHAAHKL

>sp|HBAVAR002787 G-Philadelphia. dbSNP:rs1060339

KVADALTKAVAHVDDMPNALSALSDDLHAAHKL

>sp|HBAVAR002788 J-Habana. dbSNP:rs281864853

KVADALTNVAHVDDMPNALSALSDDLHAAHKL

>sp|HBAVAR002789 Ozieri. dbSNP:rs281864853

KVADALTNVAHVDDMPNALSALSDDLHAAHKL

>sp|HBAVAR002790 Daneskgah-Teheran. dbSNP:rs281864854

KVADALTNVAHVDDMPNALSALSDDLHAAHKL

>sp|HBAVAR002791 Lille. dbSNP:rs281864856

KVADALTNVAHVADMPNALSALSDDLHAAHKL

>sp|HBAVAR002792 Chapel Hill. dbSNP:rs33921047

KVADALTNVAHVGDMPNALSALSDDLHAAHKL

>sp|HBAVAR002793 G-Pest. dbSNP:rs281864857

KVADALTNVAHVNDMPNALSALSDDLHAAHKL

>sp|HBAVAR002794 Duan. dbSNP:rs33991223

KVADALTNVAHVDDAMPNALSALSDDLHAAHKL

>sp|HBAVAR002795 Q-Iran. dbSNP:rs281864858

KVADALTNVAHVDDHMPNALSALSDDLHAAHKL

>sp|HBAVAR002796 Noko. dbSNP:rs33969953

KVADALTNVAHVDDKPNALSALSDDLHAAHKL

>sp|HBAVAR002797 Aztec. dbSNP:rs33969953

KVADALTNVAHVDDTPNALSALSDDLHAAHKL

>sp|HBAVAR002798 Guizhou. dbSNP:rs281864861

KVADALTNVAHVDDMRNALSALSDDLHAAHKL

>sp|HBAVAR002799 Davenport. dbSNP:rs111033602

KVADALTNVAHVDDMPHALSALSDDLHAAHKL

>sp|HBAVAR002800 Stanleyville-2. dbSNP:rs281860607

KVADALTNVAHVDDMPKALSALSDDLHAAHKL

>sp|HBAVAR012662 Singapore. dbSNP:rs281860603

KVADALTNVAHVDDMPNGLSALSDDLHAAHKL

>sp|HBAVAR002801 Ann Arbor; unstable. dbSNP:rs281864863

KVADALTNVAHVDDMPNARSALSDDLHAAHKL

>sp|HBAVAR002802 Nigeria. dbSNP:rs281864864

KVADALTNVAHVDDMPNALCALSDLHAAHKL

>sp|HBAVAR002803 Garden State. dbSNP:rs281864865

KVADALTNVAHVDDMPNALSALSDDLHAAHKL

>sp|HBAVAR002804 Etobicoke; O(2) affinity up. dbSNP:rs281860612

KVADALTNVAHVDDMPNALSALRDLHAAHKLRLV

>sp|HBAVAR002805 Inkster; O(2) affinity up. dbSNP:rs41331747

KVADALTNVAHVDDMPNALSALSVDLHAAHKL

>sp|HBAVAR002806 Atago; O(2) affinity up. dbSNP:rs281864777

KVADALTNVAHVDDMPNALSALSVDLHAAHKL

>sp|HBAVAR002807 Moabit; unstable. dbSNP:rs281864866

KVADALTNVAHVDDMPNALSALSDRH

>sp|HBAVAR002808 Auckland; unstable. dbSNP:rs281864868

KVADALTNVAHVDDMPNALSALSDDLNAHKL

>sp|HBAVAR002809 Iwata; unstable. dbSNP:rs281864867
KVADALTNAAVAHVDDMPNALSALSDLRA
>sp|HBAVAR002810 Loire; O(2) affinity up. dbSNP:rs35239527
KVADALTNAAVAHVDDMPNALSALSDDLHSHKL
>sp|HBAVAR _____ 90-98
Hemoglobin subunit alpha variants position 90 to 98 [90, 98]
>sp|HBAVAR002811 Handa; O(2) affinity up. dbSNP:rs281864873
KVADALTNAAVAHVDDMPNALSALSDDLHMLRV
>sp|HBAVAR049272 dbSNP:rs281864494
KFRVDPVNFKL
>sp|HBAVAR002812 Port Phillip; unstable. dbSNP:rs281864874
KVADALTNAAVAHVDDMPNALSALSDDLHAKPRV
>sp|HBAVAR002813 J-Cape Town; O(2) affinity up. dbSNP:rs281864875
KLQVDPVNFKL
>sp|HBAVAR020775 Cemenelum; O(2) affinity up. dbSNP:rs281864876
KLWVDPVNFKL
>sp|HBAVAR025389 Bassett; markedly reduced oxygen affinity. dbSNP:rs281864879
KLRVAPVNFKL
>sp|HBAVAR002814 Setif; unstable. dbSNP:rs281864878
KLRVYPVNFKL
>sp|HBAVAR002815 Denmark Hill; O(2) affinity up. dbSNP:rs281864881
KLRVDVNFKL
>sp|HBAVAR002816 Goda>VARi; O(2) affinity up. dbSNP:rs281864881
KLRVDTVNFKL
>sp|HBAVAR002817 Dallas; O(2) affinity up. dbSNP:rs41338947
KLRVDPVKFKL
>sp|HBAVAR _____ 99-126
Hemoglobin subunit alpha variants position 99 to 126 [99, 126]
>sp|HBAVAR002818 Turriff. dbSNP:rs281864882
RVDPVNFELLSHCLLVTLAAHLPAEFTPAVHASLDKF
>sp|HBAVAR002819 Manitoba; slightly unstable. dbSNP:rs41344646
RHCLLVTLAAHLPAEFTPAVHASLDKF
>sp|HBAVAR002820 Contaldo; unstable. dbSNP:rs63750752
RCLLVTLAAHLPAEFTPAVHASLDKF
>sp|HBAVAR025390 Charolles. dbSNP:rs63750073
KLLSYCLLVTLAAHLPAEFTPAVHASLDKF
>sp|HBAVAR002821 Suan-Dok; unstable; causes alpha-thalassemia. dbSNP:rs41479844
KLLSHCLLVTRAAHLPAEFTPAVHASLDKF
>sp|HBAVAR002822 Petah Tikva; unstable; causes alpha-thalassemia. dbSNP:rs28928889
KLLSHCLLVTLDAHLPAEFTPAVHASLDKF
>sp|HBAVAR002823 Hopkins-II; unstable. dbSNP:rs281864885
KLLSHCLLVTLAADLPAEFTPAVHASLDKF
>sp|HBAVAR002824 Twin Peaks. dbSNP:rs281860618
KLLSHCLLVTLAAHHPAEFTPAVHASLDKF
>sp|HBAVAR002825 Nouakchott. dbSNP:rs267607269
KLLSHCLLVTLAAHLLAEFTPAVHASLDKF
>sp|HBAVAR002826 Chiapas. dbSNP:rs267607269
KLLSHCLLVTLAAHLRAEFTPAVHASLDKF
>sp|HBAVAR002827 Melusine. dbSNP:rs281864887
KLLSHCLLVTLAAHLSAEFTPAVHASLDKF
>sp|HBAVAR002828 J-Tongariki. dbSNP:rs281864888
KLLSHCLLVTLAAHLPDEFTPAVHASLDKF
>sp|HBAVAR002829 Ube-4. dbSNP:rs281864946
KLLSHCLLVTLAAHLPAAFTPAVHASLDKF
K.FLASVSTVLTSKYR.- [127, 140] (missed 1)
>sp|HBAVAR002830 Zaire.
KLLSHCLLVTLAAHLPAEHLPAEFTPAVHASLDKF
>sp|HBAVAR002831 Phnom Penh.
KLLSHCLLVTLAAHLPAEFTPAVHASLDKF
>sp|HBAVAR002832 Grady.
KLLSHCLLVTLAAHLPAEFTEFTPAVHASLDKF
>sp|HBAVAR002833 J-Meerut/J-Birmingham. dbSNP:rs36075744
KLLSHCLLVTLAAHLPAEFTPEVHASLDKF
>sp|HBAVAR002834 Owari. dbSNP:rs35187567
KLLSHCLLVTLAAHLPAEFTPAMHASLDKF
>sp|HBAVAR002835 Westmead. dbSNP:rs41479347

KLLSHCLLVTLAAHLPAEFTPAVQASLDKF
 >sp|HBAVAR002836 Quong Sze; causes alpha-thalassemia. dbSNP:rs41397847
 KLLSHCLLVTLAAHLPAEFTPAVHASPKF
 >sp|HBAVAR025391 Plasencia; family with moderate microcytosis and hypochromia.
 dbSNP:rs41397847
 >sp|HBAVAR_____127-140
 Hemoglobin subunit alpha variants position 127 to 140 [127, 140]
 KLLSHCLLVTLAAHLPAEFTPAVHASRD
 >sp|HBAVAR025392 West One. dbSNP:rs33957766
 KLLSHCLLVTLAAHLPAEFTPAVHASLGKF
 >sp|HBAVAR002837 Fukutomi; O(2) affinity up. dbSNP:rs33957766
 KLLSHCLLVTLAAHLPAEFTPAVHASLVKF
 >sp|HBAVAR002838 Montefiore; O(2) affinity up. dbSNP:rs33933481
 KLLSHCLLVTLAAHLPAEFTPAVHASLYKF
 >sp|HBAVAR002839 Jackson. dbSNP:rs33972894
 KLLSHCLLVTLAAHLPAEFTPAVHASLDNFLASVSTVLTISKY
 >sp|HBAVAR002840 Tunis-Bizerte; unstable; causes alpha-thalassemia. dbSNP:rs281864889
 KFLPASVSTVLTISKY
 >sp|HBAVAR002842 Yuda; O(2) affinity down. dbSNP:rs41528545
 KFLDSVSTVLTISKY
 >sp|HBAVAR002841 Sun Prairie; unstable. dbSNP:rs41529844
 KFLPSVSTVLTISKY
 >sp|HBAVAR002843 Questembert; highly unstable; causes alpha-thalassemia.
 dbSNP:rs63751417
 KFLAPVSTVLTISKY
 >sp|HBAVAR002844 Val de Marne; O(2) affinity up. Corresponds to >VARiants
 dbSNP:rs56308100 and dbSNP:rs55948437Ensembl
 KFLASVRTVLTISKY
 >sp|HBAVAR002845 Pavie. dbSNP:rs63749809
 KFLASVSTELTISKY
 >sp|HBAVAR002846 Chicago. dbSNP:rs41364652
 KFLASVSTVMTISKY
 >sp|HBAVAR002847 Bibba; unstable; causes alpha-thalassemia. dbSNP:rs41469945
 KFLASVSTVPTISKY
 >sp|HBAVAR035242 Toyama. dbSNP:rs41469945
 KFLASVSTVRT
 >sp|HBAVAR002848 Attleboro; O(2) affinity up. dbSNP:rs63750801
 KFLASVSTVLTIPKY
 >sp|HBAVAR002849 Hanamaki; O(2) affinity up. dbSNP:rs41361546
 KFLASVSTVLTSEYR
 >sp|HBAVAR002850 Tokoname; O(2) affinity up. dbSNP:rs56348461
 KFLASVSTVLTSTYR
 >sp|HBAVAR002851 Rouen/Ethiopia; O(2) affinity up. dbSNP:rs55870409
 KFLASVSTVLTSKHR
 >sp|HBAVAR002852 Nunobiki; O(2) affinity up. dbSNP:rs63750134
 KFLASVSTVLTISKYC
 >sp|HBAVAR002854 Suresnes; O(2) affinity up. dbSNP:rs33935328
 KFLASVSTVLTISKYH
 >sp|HBAVAR002853 Legnano; O(2) affinity up. dbSNP:rs33935328
 KFLASVSTVLTISKYL
 >sp|HBAVAR002855 Singapore. dbSNP:rs33935328
 KFLASVSTVLTISKYP
 >sp|HBBVAR_____00-07
 Hemoglobin subunit beta variants position 0 to 7 [0, 7]
 >sp|HBBVAR002856 Raleigh; O(2) affinity down. dbSNP:rs33949930
 AHLTPPEKS
 >sp|HBBVAR002857 Graz. dbSNP:rs33983205
 VLLTPPEKS
 >sp|HBBVAR002858 Okayama; O(2) affinity up. dbSNP:rs713040
 VQLTPPEKS
 >sp|HBBVAR002859 Deer Lodge; O(2) affinity up. dbSNP:rs33983205
 RLTPEKS
 >sp|HBBVAR002860 Fukuoka. dbSNP:rs35906307
 VYLTPEKS

>sp|HBBVAR002861 Warwickshire. dbSNP:rs34769005
 VHLTREEKS)
 >sp|HBBVAR002862 G-Makassar. dbSNP:rs334
 VHLTPAEKSAVTALWGKV
 >sp|HBBVAR002863 SKCA; Hb S; at heterozygosity confers resistance to malaria.
 dbSNP:rs334
 VHLTPVEKS
 >sp|HBBVAR_____08-16
 Hemoglobin subunit beta variants position 08 to 16 [8, 16]
 >sp|HBBVAR002864 Hb C; confers resistance to severe malaria. dbSNP:rs33930165
 VHLTPKEKS
 >sp|HBBVAR002865 Machida. dbSNP:rs33930165
 VHLTPQEKS
 >sp|HBBVAR002866 G-San Jose; mildly unstable. dbSNP:rs34387455
 VHLTPPEGKS
 >sp|HBBVAR002867 G-Siriraj. dbSNP:rs34948328
 VHLTPPEKK
 >sp|HBBVAR002868 N-Timone. dbSNP:rs33926764
 VHLTPPEESAVTALWGKV
 >sp|HBBVAR002869 J-Luhe. dbSNP:rs33926764
 VHLTPPEQSAVTALWGKV
 >sp|HBBVAR002870 Rio Grande. dbSNP:rs33932981
 VHLTPPEETSAVTALWGKV
 >sp|HBBVAR002871 Porto Alegre; O(2) affinity up. dbSNP:rs33918131
 KCAVTALWGKV
 >sp|HBBVAR002872 Ankara. dbSNP:rs33947457
 KSDVTALWGKV
 >sp|HBBVAR025393 Iraq-Halabja. dbSNP:rs33947457
 KSVVTALWGKV
 >sp|HBBVAR002873 Windsor; O(2) affinity up; unstable. dbSNP:rs35140348
 KSADTALWGKV
 >sp|HBBVAR002874 Hamilton. dbSNP:rs33974228
 KSAITALWGKV
 >sp|HBBVAR002875 J-Lens. dbSNP:rs35203747
 KSAVTDLWGKV
 >sp|HBBVAR002876 Saki; unstable. dbSNP:rs33935445
 KSAVTAPWGKV
 >sp|HBBVAR002877 Soegn; unstable. dbSNP:rs33935445
 KSAVTARWGKV
 >sp|HBBVAR002878 Randwick; unstable. dbSNP:rs33946157
 KSAVTALGGKV
 >sp|HBBVAR002879 Belfast; O(2) affinity up; unstable. dbSNP:rs33946157
 KSAVTALRGKV
 >sp|HBB_____VAR17-29
 Hemoglobin subunit beta variants position 17 to 29 [17, 29]
 >sp|HBBVAR002880 J-Baltimore/J-Trinidad/J-Ireland/J-Georgia/N-New Haven.
 dbSNP:rs33962676
 KSAVTALWDKV
 >sp|HBBVAR002881 D-Bushman. dbSNP:rs63751285
 KSAVTALWRK
 >sp|HBBVAR002882 Nagasaki. dbSNP:rs33986703
 KSAVTALWGEVNVDEVGGEALGRL
 >sp|HBBVAR002883 J-Amiens. dbSNP:rs36006214
 KSAVTALWGNVNVDEVGGEALGRL
 >sp|HBBVAR002884 Nikosia. dbSNP:rs33986703
 KSAVTALWGQVNVDEVGGEALGRL
 >sp|HBBVAR002885 Baden; slightly unstable. dbSNP:rs35802118
 KMNVDEVGGEALGRL
 >sp|HBBVAR002886 Alamo. dbSNP:rs34866629
 KVDVDEVGGEALGRL
 >sp|HBBVAR002887 D-Ouleh RABAH. dbSNP:rs63750840
 KVDEVGGEALGRL
 >sp|HBBVAR002888 Malay. dbSNP:rs33972047
 KVSDEVGGEALGRL
 >sp|HBBVAR002889 Olympia; O(2) affinity up. dbSNP:rs35890959
 KVNDEVGGEALGRL

>sp|HBBVAR002890 Connecticut; O(2) affinity down. dbSNP:rs33977536
 KVVNVEVGGEALGRL
 >sp|HBBVAR002892 Karlskoga. dbSNP:rs33950093
 KVVNVEVGGEALGRL
 >sp|HBBVAR002891 Cocody. dbSNP:rs33950093
 KVVNVEVGGEALGRL
 >sp|HBBVAR002893 Yusa. dbSNP:rs33950093
 KVVNVEVGGEALGRL
 >sp|HBBVAR002894 G-Coushatta/G-Saskatoon/G-Taegu/Hsin Chu. dbSNP:rs33936254
 KVVNDAVGGGEALGRL
 >sp|HBBVAR002895 G-Taipei. dbSNP:rs33936254
 KVVNDVGGGEALGRL
 >sp|HBBVAR002896 E-Saskatoon. dbSNP:rs33959855
 KVVNDKVGGEALGRL
 >sp|HBBVAR002897 D-Iran. dbSNP:rs33959855
 KVVNDQVGGEALGRL
 >sp|HBBVAR002898 D-Granada. dbSNP:rs33936254
 KVVNDVVGGEALGRL
 >sp|HBBVAR002899 Strasbourg; O(2) affinity up. dbSNP:rs33945546
 KVVNDEDDGGGEALGRL
 >sp|HBBVAR002900 Palmerston North; O(2) affinity up; unstable. dbSNP:rs33929459
 KVVNDEFGGEALGRL
 >sp|HBBVAR002901 Miyashiro; O(2) affinity up; unstable. dbSNP:rs33945546
 KVVNDEGGGEALGRL
 >sp|HBBVAR069169 Freiburg. dbSNP:rs34160180
 KVVNDEGGGEALGRL
 >sp|HBBVAR002902 Moscva; O(2) affinity down; unstable. dbSNP:rs33968721
 KVVNDEVDGGEALGRL
 >sp|HBBVAR002903 Riverdale-Bronx; O(2) affinity up; unstable. dbSNP:rs33972975
 KVVNDEVRGGEALGRL
 >sp|HBBVAR002904 Savannah; unstable. dbSNP:rs33968721
 KVVNDEVVGGGEALGRL
 >sp|HBBVAR002905 J-Auckland; unstable; O(2) affinity down. dbSNP:rs35474880
 KVVNDEVGDEALGRL
 >sp|HBBVAR002906 G-Taiwan Ami. dbSNP:rs34404985
 KVVNDEVGREALGRL
 >sp|HBBVAR002907 B-THAL; Hb E; confers resistance to severe malaria. dbSNP:rs33950507
 KVVNDEVGGKA
 >sp|HBBVAR002908 Henri Mondor; slightly unstable. dbSNP:rs33915112
 KVVNDEVGGVALGRL
 >sp|HBBVAR002909 Volga/Drenthe; unstable. dbSNP:rs33954632
 KVVNDEVGGEDLGRL
 >sp|HBBVAR002910 Knossos. dbSNP:rs35424040
 KVVNDEVGGESLGRL
 >sp|HBBVAR002911 Grange-blanche; O(2) affinity up. dbSNP:rs33954632
 KVVNDEVGGEVLGRL
 >sp|HBBVAR002912 Genova/Hyogo; unstable. dbSNP:rs33916412
 KVVNDEVGGEAPGRL
 >sp|HBBVAR035236 St Louis. dbSNP:rs33916412
 KVVNDEVGGEAQGRL
 >sp|HBBVAR002913 Lufkin; unstable. dbSNP:rs35685286
 KVVNDEVGGEALDRL
 >sp|HBBVAR002914 Tacoma; unstable. dbSNP:rs1135071
 KVVNDEVGGEALGSLLVVYPWTQRF
 >sp|HBBVAR002915 Yokohama; unstable. dbSNP:rs33920173
 KVVNDEVGGEALGRPLVVYPWTQRF
 >sp|HBBVAR002916 Castilla; unstable. dbSNP:rs33948578
 RLVVYPWTQRF
 >sp|HBBVAR002917 Muscat; slightly unstable. dbSNP:rs34314652
 RLVVYPWTQRF
 >sp|HBBVAR025394 Santander; unstable. dbSNP:rs1135101
 RLLVDYPWTQRF
 >sp|HBBVAR002918 Pitie-Salpetriere; O(2) affinity up. dbSNP:rs1141387
 RLLVFPWTQRF

VAR30-39

Hemoglobin subunit beta variants position 30 to 39 [30, 39]

>sp|HBBVAR025395 Nantes; increased oxygen affinity. dbSNP:rs1141387
 RLLVLYPWTQRF
 >sp|HBBVAR002919 Philly; O(2) affinity up; unstable. dbSNP:rs35857380
 RLLVVPWTQRF
 >sp|HBBVAR002920 Sunnybrook. dbSNP:rs33993004
 RLLVVYRWTQRF
 >sp|HBBVAR002921 North Chicago; O(2) affinity up. dbSNP:rs33948615
 RLLVYSWTQRF
 >sp|HBBVAR002922 Linkoping/Finlandia; O(2) affinity up. dbSNP:rs33948615
 RLLVVYTWTQRF
 >sp|HBBVAR002923 Howick. dbSNP:rs33994623
 RLLVYPGTQRF
 >sp|HBBVAR002925 Rothschild; O(2) affinity down. dbSNP:rs33994623
 RLLVVYPRT
 >sp|HBBVAR002924 Hirose; O(2) affinity up. dbSNP:rs33991059
 RLLVVYPSTQRF
 >sp|HBBVAR002926 Hinwil; O(2) affinity up. dbSNP:rs34703513
 RLLVVYPWNQRF
 >sp|HBBVAR002927 Vaasa; unstable. dbSNP:rs11549407
 RLLVVYPWTERF
 >sp|HBBVAR002928 Alabama. dbSNP:rs11549407
 RLLVVYPWTKR
 >sp|HBBVAR002929 Tianshui. dbSNP:rs35973315
 RLLVVYPWTRR
 >sp|HBBVAR002930 Mequon. dbSNP:rs33926796
 RYFESFGDLSTPDVAVMGNPKV
 >sp|HBBVAR035237 42 Missing in Bruxelles.
 RFESFGDLSTPDVAVMGNPKV
 >sp|HBBVAR002931 Louisville; unstable. dbSNP:rs33924146
 RFLESFGDLSTPDVAVMGNPKV
 >sp|HBBVAR035239 Hammersmith. dbSNP:rs34378160
 RFSESGDLSTPDVAVMGNPKV
 >sp|HBBVAR002932 Hoshida/Chaya. dbSNP:rs33922842
 RFFQSFGLSTPDVAVMGNPKV
 >sp|HBBVAR002933 Mississippi. dbSNP:rs34868397
 RFFECFGLSTPDVAVMGNPKV
 >sp|HBBVAR002934 Cheverly; unstable. dbSNP:rs33978338
 RFFESSGDLSTPDVAVMGNPKV
 >sp|HBBVAR002935 K-Ibadan. dbSNP:rs35303218
 RFFESFEDLSTPDVAVMGNPKV
 >sp|HBBVAR002936 Avicenna. dbSNP:rs33980484
 RFFESFGALSTPDVAVMGNPKV
 >sp|HBBVAR002937 Gavello. dbSNP:rs33980484
 RFFESFGGLSTPDVAVMGNPKV
 >sp|HBBVAR002938 Maputo. dbSNP:rs33932070
 RFFESFGYLSTPDVAVMGNPKV
 >sp|HBBVAR002939 Bab-Saadoum; slightly unstable. dbSNP:rs33952850
 RFFESFGDPSTPDVAVMGNPKV
 >sp|HBBVAR002940 Las Palmas; slightly unstable. dbSNP:rs33960931
 RFFESFGDLFTPDVAVMGNPKV
 >sp|HBBVAR002941 Edmonton.
 RFFESFGDLSPDAVAVMGNPKV
 >sp|HBBVAR002942 Willamette; O(2) affinity up; unstable. dbSNP:rs33969727
 RFFESFGDLSTRDAVAVMGNPKVKA
 >sp|HBBVAR002943 Ocho Rios. dbSNP:rs33919924
 RFFESFGDLSTPAVAVMGNPKV
 >sp|HBBVAR002944 Summer Hill. dbSNP:rs33961886
 RFFESFGDLSTPHAVMGNPKV
 >sp|HBBVAR002945 Jacksonville; O(2) affinity up; unstable. dbSNP:rs34037627
 RFFESFGDLSTPADVAVMGNPKV
 >sp|HBBVAR002946 Matera; unstable. dbSNP:rs35094013
 RFFESFGDLSTPDVAVKGV
 >sp|HBBVAR002947 Hamadan. dbSNP:rs33935983
 RFFESFGDLSTPDVAVMRN

VAR40-58

>sp|HBBVAR002948 G-ferrara; unstable. dbSNP:rs35278874
RFFESFGDLSTPDAVMGKPKV
>sp|HBBVAR _____ 59-64
Hemoglobin subunit beta variants position 59 to 64 [59, 64]
>sp|HBBVAR002949 Dhofar/Yukuhashi. dbSNP:rs33991472
RFFESFGDLSTPDAVMGNRK
>sp|HBBVAR002950 I-High Wycombe. dbSNP:rs33969400
RFFESFGDLSTPDAVMGNPEVKA
>sp|HBBVAR002952 N-Seattle. dbSNP:rs33995148
RFFESFGDLSTPDAVMGNPKVEAHGKK
>sp|HBBVAR002953 Bologna; O(2) affinity down. dbSNP:rs34974709
RFFESFGDLSTPDAVMGNPKVMAHGKK
>sp|HBBVAR002954 Hikari. dbSNP:rs34446260
RFFESFGDLSTPDAVMGNPKVNAHGKK
>sp|HBBVAR002956 Duarte; unstable. dbSNP:rs34933455
RFFESFGDLSTPDAVMGNPKVKPHGKK
>sp|HBBVAR _____ 65-81
Hemoglobin subunit beta variants position 65 to 81 [65, 81]
>sp|HBBVAR002958 J-Antakya. dbSNP:rs33932548
KAHGKVLGAFSDGLAHLNLKG
>sp|HBBVAR002959 J-Sicilia. dbSNP:rs35747961
KAHGKVLGAFSDGLAHLNLKG
>sp|HBBVAR079528 Vigo; O(2) affinity down.
KIVLGAFSDGLAHLNLKG
>sp|HBBVAR002961 Chico; O(2) affinity down. dbSNP:rs35939489
KTVLGAFSDGLAHLNLKG
>sp|HBBVAR002962 Sydney; unstable. dbSNP:rs33918343
KALGAFSDGLAHLNLKG
>sp|HBBVAR035240 Bristol.
KDLGAFSDGLAHLNLKG
>sp|HBBVAR040060 non-spherocytic haemolytic anemia; Manukau. dbSNP:rs33918343
KGLGAFSDGLAHLNLKG
>sp|HBBVAR002963 Alesha; unstable. dbSNP:rs36008922
KMLGAFSDGLAHLNLKG
>sp|HBBVAR002964 Brisbane; O(2) affinity up. dbSNP:rs33972593
KVHGAFSDGLAHLNLKG
>sp|HBBVAR002965 Mizuho; unstable. dbSNP:rs33972593
KVPGFSDGLAHLNLKG
>sp|HBBVAR002966 Rambam. dbSNP:rs34718174
KVLDAFSDGLAHLNLKG
>sp|HBBVAR002967 Kenitra. dbSNP:rs33947415
RAFSDGLAHLNLKG
>sp|HBBVAR002968 City of Hope. dbSNP:rs33947415
KVLSAFSDGLAHLNLKG
>sp|HBBVAR002969 Seattle; O(2) affinity down; unstable. dbSNP:rs33946401
KVLGDFSDGLAHLNLKG
>sp|HBBVAR002970 Christchurch; unstable. dbSNP:rs34362537
KVLGASSDGLAHLNLKG
>sp|HBBVAR002971 Tilburg; O(2) affinity down. dbSNP:rs33967755
KVLGAFSGGLAHLNLKG
>sp|HBBVAR002972 Mobile; O(2) affinity down. dbSNP:rs33967755
KVLGAFSVGLAHLNLKG
>sp|HBBVAR002973 Vancouver; O(2) affinity down. dbSNP:rs33945705
KVLGAFSYGLAHLNLKG
>sp|HBBVAR002974 Aalborg; unstable. dbSNP:rs33916541
KVLGAFSDRLAHLNLKG
>sp|HBBVAR002975 Bushwick; unstable. dbSNP:rs33976006
KVLGAFSDVLAHLNLKG
>sp|HBBVAR002976 Atlanta; unstable. dbSNP:rs33950542
KVLGAFSDGPAHLNLKG
>sp|HBBVAR002977 Pasadena; O(2) affinity up; unstable. dbSNP:rs33950542
KVLGAFSDGRAHLNLKG
>sp|HBBVAR002978 J-Chicago. dbSNP:rs33985847
KVLGAFSDGLDHLNLKG
>sp|HBBVAR002979 J-Iran. dbSNP:rs33991294
KVLGAFSDGLADLNLKG

>sp|HBBVAR002980 Costa Rica. dbSNP:rs33952543
 KVLGAFSDGLARLDNLKG
 >sp|HBBVAR002981 Fukuyama. dbSNP:rs33991294
 KVLGAFSDGLAYLDNLKG
 >sp|HBBVAR002982 Quin-hai. dbSNP:rs34870172
 KVLGAFSDGLAHRD
 >sp|HBBVAR002983 Tampa. dbSNP:rs33990858
 KVLGAFSDGLAHLNLYNLKG
 >sp|HBBVAR002984 G-Szuhu/Gifu. dbSNP:rs35890380
 KVLGAFSDGLAHLDKL
 >sp|HBBVAR _____ 82-94
 Hemoglobin subunit beta variants position 82 to 94 [82, 94]
 >sp|HBBVAR012663 La Roche-sur-Yon; unstable and O(2) affinity up. dbSNP:rs33936967
 KVLGAFSDGLAHLDNHKG
 >sp|HBBVAR002985 Baylor; unstable. dbSNP:rs33936967
 KVLGAFSDGLAHLNDRK
 >sp|HBBVAR049273 dbSNP:rs11549406
 KVLGAFSDGLAHLDNVKG
 >sp|HBBVAR002986 Helsinki; O(2) affinity up. dbSNP:rs33987903
 KVLGAFSDGLAHLNLMGTFATLSELHCDKL
 >sp|HBBVAR012664 Providence. dbSNP:rs33991993
 KVLGAFSDGLAHLNLMGTFATLSELHCDKL
 >sp|HBBVAR025396 Pyrgos. dbSNP:rs1803195
 KDTFATLSELHCDKL
 >sp|HBBVAR002987 Muskegon. dbSNP:rs33930385
 RTFATLSELHCDKL
 >sp|HBBVAR002988 Kofu. dbSNP:rs35914488
 KGIFATLSELHCDKL
 >sp|HBBVAR002989 Olomouc; O(2) affinity up. dbSNP:rs35819837
 KGTFDTLSELHCDKL
 >sp|HBBVAR002990 Quebec-Chori. dbSNP:rs33993568
 KGTFAILSELHCDKL
 >sp|HBBVAR002991 D-Ibadan. dbSNP:rs33993568
 KGTFAKLSELHCDKL
 >sp|HBBVAR002992 Valletta. dbSNP:rs35553496
 KGTFAPLSELHCDKL
 >sp|HBBVAR002993 Santa Ana; unstable. dbSNP:rs33940204
 KGTFATPSELHCDKL
 >sp|HBBVAR002994 Boras; unstable. dbSNP:rs33940204
 KGTFATRSELHCDKL
 >sp|HBBVAR002995 Creteil; O(2) affinity up. dbSNP:rs33917628
 KGTFATLNELHCDKL
 >sp|HBBVAR002996 Vanderbilt; O(2) affinity up. dbSNP:rs35351128
 KGTFATLRELHCDKL
 >sp|HBBVAR002997 Pierre-Benite; O(2) affinity up. dbSNP:rs35002698
 KGTFATLSDLHCDKL
 >sp|HBBVAR002998 Agenogi; O(2) affinity down. dbSNP:rs33913712
 KGTFATLSKLHCDKL
 >sp|HBBVAR002999 Sabine; unstable. dbSNP:rs33917785
 KGTFATLSEPHCDKL
 >sp|HBBVAR003000 Caribbean; O(2) affinity down; unstable. dbSNP:rs33917785
 KGTFATLSERH
 >sp|HBBVAR003001 J-Altgelds Gardens; unstable. dbSNP:rs33924775
 KGTFATLSELDCDKL
 >sp|HBBVAR003002 Isehara; unstable. dbSNP:rs33924775
 KGTFATLSELNCDKL
 >sp|HBBVAR003003 Newcastle and Duino; associated with S-104
 KGTFATLSELPCDKL
 >sp|HBBVAR003004 Istanbul; unstable. dbSNP:rs34083951
 KGTFATLSELQCDKL
 >sp|HBBVAR003005 Okazaki; O(2) affinity up; unstable. dbSNP:rs33972927
 KGTFATLSELHRD
 >sp|HBBVAR _____ 95-103
 Hemoglobin subunit beta variants position 95 to 103 [95, 103]
 >sp|HBBVAR003006 Chandigarh. dbSNP:rs34579351
 KGTFATLSELHCGKL

>sp|HBBVAR003007 Barcelona; O(2) affinity up. dbSNP:rs33959340
 KGTFATLSELHCHKL
 >sp|HBBVAR003008 Bunbury; O(2) affinity up. dbSNP:rs33959340
 KGTFATLSELHCNKL
 >sp|HBBVAR003009 J-Cordoba. dbSNP:rs35204496
 KGTFATLSELHCDMLHVDPENFRL
 >sp|HBBVAR003010 Detroit. dbSNP:rs36038739
 KGTFATLSELHCDNLHVDPENFRL
 >sp|HBBVAR003011 Debrousse; unstable; O(2) affinity up. dbSNP:rs36081208
 KGTFATLSELHCDKPHVDPENFRL
 >sp|HBBVAR003012 Regina; O(2) affinity up. dbSNP:rs34665886
 KVHVDPENFRL
 >sp|HBBVAR003013 Wood; O(2) affinity up. dbSNP:rs33951978
 KLLVDPENFRL
 >sp|HBBVAR003014 Nagoya; O(2) affinity up; unstable. dbSNP:rs33951978
 KLPVDPENFRL
 >sp|HBBVAR003015 Malmoe; O(2) affinity up. dbSNP:rs34515413
 KLQVDPENFRL
 >sp|HBBVAR003016 Moriguchi. dbSNP:rs33950993
 KLYVDPENFRL
 >sp|HBBVAR003017 Nottingham; unstable. dbSNP:rs33985510
 KLHGDPENFRL
 >sp|HBBVAR003018 Coimbra; O(2) affinity up. dbSNP:rs34013622
 KLHVEPENFRL
 >sp|HBBVAR003019 Brigham; O(2) affinity up. dbSNP:rs33965000
 KLHVDLENFRL
 >sp|HBBVAR003020 New Mexico. dbSNP:rs33965000
 KLHVDRENFRL
 >sp|HBBVAR003021 Potomac; O(2) affinity up. dbSNP:rs35209591
 KLHVDPDNFRL
 >sp|HBBVAR003022 Alberta; O(2) affinity up. dbSNP:rs33937393
 KLHVDPGNFRL
 >sp|HBBVAR003023 British Columbia; O(2) affinity up. dbSNP:rs33966487
 KLHVDPKNFRL
 >sp|HBBVAR003024 Rush; unstable. dbSNP:rs33966487
 KLHVDPQNFRL
 >sp|HBBVAR003025 Beth Israel; O(2) affinity down; unstable. dbSNP:rs33948057
 KLHVDPESFRL
 >sp|HBBVAR003026 St Mandé; O(2) affinity down. dbSNP:rs33927739
 KLHVDPPEYFRL
 >sp|HBBVAR_____104-119
 Hemoglobin subunit beta variants position 104 to 119 [104, 119]
 >sp|HBBVAR003027 Heathrow; O(2) affinity up. dbSNP:rs35067717
 KLHVDPENLRL
 >sp|HBBVAR003028 Camperdown and Duino; associated with P-92
 KLHVDPENFSLGNVLCVLAHHFGKE
 >sp|HBBVAR003029 Sherwood Forest. dbSNP:rs33911434
 KLHVDPENFTLLGNVLCVLAHHFGKE
 >sp|HBBVAR003030 Burke; O(2) affinity down; unstable. dbSNP:rs35017910
 RNVLCVLAHHFGKE
 >sp|HBBVAR003031 Presbyterian; O(2) affinity down; unstable. dbSNP:rs34933751
 KVLVCVLAHHFGKE
 >sp|HBBVAR003032 San Diego; O(2) affinity up. dbSNP:rs33969677
 RLLGNMLVCVLAHHFGKE
 >sp|HBBVAR003033 Showa-Yakushiji. dbSNP:rs35256489
 RLLGNVPVCVLAHHFGKE
 >sp|HBBVAR003034 Stanmore; O(2) affinity down; unstable. dbSNP:rs35871407
 RLLGNVLACVLAHHFGKE
 >sp|HBBVAR025397 Canterbury. dbSNP:rs33932908
 RLLGNLVFVLAHHFGKE
 >sp|HBBVAR003035 Indianapolis. dbSNP:rs35849199
 RLLGNLVVRVLAHHFGKE
 >sp|HBBVAR003036 Yahata. dbSNP:rs33932908
 RLLGNLVVYVLAHHFGKE
 >sp|HBBVAR010144 Zengcheng. dbSNP:rs33917394
 RLLGNLVLCVMAHHFGKE

>sp|HBBVAR010145 B-THAL; Durham-N.C./Brescia. dbSNP:rs36015961
 RLLGNVLCVPAHHFGKE
 >sp|HBBVAR003037 B-THAL; Hradec Kralove; unstable. dbSNP:rs35485099
 RLLGNVLCVLDHFFGKE
 >sp|HBBVAR003038 Madrid; unstable. dbSNP:rs34945623
 RLLGNVLCVLPHHFGKE
 >sp|HBBVAR025398 Vexin; increased oxygen affinity. dbSNP:rs33978082
 RLLGNVLCVLAHFGKE
 >sp|HBBVAR003039 Hafnia. dbSNP:rs35209776
 RLLGNVLCVLAQHFGKE
 >sp|HBBVAR003040 Saitama; unstable. dbSNP:rs33935673
 RLLGNVLCVLAHFFGKE
 >sp|HBBVAR003041 P-Galveston. dbSNP:rs33935673
 RLLGNVLCVLAHRF
 >sp|HBBVAR025399 Tsukumi. dbSNP:rs33935527
 RLLGNVLCVLAHYFGKE
 >sp|HBBVAR

120-131

Hemoglobin subunit beta variants position 120 to 131 [120, 131]
 >sp|HBBVAR003042 Iowa. dbSNP:rs33947020
 RLLGNVLCVLAHHFAKE
 >sp|HBBVAR003043 Hijiyama. dbSNP:rs33924134
 RLLGNVLCVLAHHFGEEFTPPVQAAYQKV
 >sp|HBBVAR003044 Jianghua. dbSNP:rs34303736
 RLLGNVLCVLAHHFGIEFTPPVQAAYQKV
 >sp|HBBVAR003045 Takamatsu. dbSNP:rs33924134
 RLLGNVLCVLAHHFGQEFTPPVQAAYQKV
 >sp|HBBVAR003046 D-Neath. dbSNP:rs33987957
 KAFTPPVQAAYQKV
 >sp|HBBVAR003047 St Francis. dbSNP:rs33987957
 KGFTPPVQAAYQKV
 >sp|HBBVAR003049 O-Arab. dbSNP:rs33946267
 KFTPPVQAAYQKV
 >sp|HBBVAR003048 D-Los Angeles/D-Punjab/D-Portugal/D-Chicago/D-Oak Ridge.
 dbSNP:rs33946267
 KQFTPPVQAAYQKV
 >sp|HBBVAR003050 D-Camperdown-Beograd. dbSNP:rs33987957
 KVFTPPVQAAYQKV
 >sp|HBBVAR003051 Villejuif; asymptomatic variant. dbSNP:rs33935383
 KEFIPPVQAAYQKV
 >sp|HBBVAR003053 Ty Gard; O(2) affinity up. dbSNP:rs33983276
 KEFTQPVQAAYQKV
 >sp|HBBVAR003052 Khartoum; unstable. dbSNP:rs33983276
 KEFTRPVQAAYQKV
 >sp|HBBVAR003054 Tunis. dbSNP:rs35461710
 KEFTSPVQAAYQKV
 >sp|HBBVAR003055 Beirut. dbSNP:rs33925391
 KEFTPPQAAYQKV
 >sp|HBBVAR003057 Hofu; unstable. dbSNP:rs33925391
 KEFTPPEQAAYQKV
 >sp|HBBVAR003056 B-THAL; Dhonburi-Neapolis; unstable. dbSNP:rs33925391
 KEFTPPGQAAYQKV
 >sp|HBBVAR003058 Complutense. dbSNP:rs33971634
 KEFTPPVEAAYQKV
 >sp|HBBVAR003059 Brest; unstable. dbSNP:rs33971634
 KEFTPPVKAAYQKV
 >sp|HBBVAR003060 J-Guantanamo; unstable. dbSNP:rs33957286
 KEFTPPVQDAYQKV
 >sp|HBBVAR003061 Crete; O(2) affinity up; unstable. dbSNP:rs35939430
 KEFTPPVQAPYQKV
 >sp|HBBVAR003062 La Desirade; O(2) affinity down; unstable. dbSNP:rs111645889
 KEFTPPVQAVYQKV
 >sp|HBBVAR003063 Wien; unstable. dbSNP:rs35834416
 KEFTPPVQAADQKV
 >sp|HBBVAR003064 Nevers. dbSNP:rs33937535
 KEFTPPVQAASQKV

132-145

```

>sp|HBBVAR
Hemoglobin subunit beta variants position 132 to 145 [132, 147]
>sp|HBBVAR003065 Camden-Tokuchi-Motown. dbSNP:rs33910209
KEFTPPVQAAYEKV
>sp|HBBVAR003066 Shelby/Leslie/Deaconess; unstable. dbSNP:rs33910209
KEFTPPVQAAYKK
>sp|HBBVAR003067 Shangai; unstable. dbSNP:rs33950778
KEFTPPVQAAYPKV
>sp|HBBVAR003068 Sarrebourg; unstable. dbSNP:rs33950778
KEFTPPVQAAYRK
>sp|HBBVAR003069 Yamagata; O(2) affinity down. dbSNP:rs33946775
KEFTPPVQAAYQNVVAGVANALAHKY
>sp|HBBVAR003070 K-Woolwich. dbSNP:rs33953406
KEFTPPVQAAYQQVVAGVANALAHKY
>sp|HBBVAR003071 Extredemura. dbSNP:rs34095019
KLVAGVANALAHKY
>sp|HBBVAR003072 North Shore-Caracas; unstable. dbSNP:rs33966761
KVEAGVANALAHKY
>sp|HBBVAR003073 Beckman; originally reported as E-136; O(2) affinity down; unstable.
dbSNP:rs35669628
KVVDGVANALAHKY
>sp|HBBVAR003074 Altdorf; O(2) affinity up; unstable. dbSNP:rs35492035
KVVPGVANALAHKY
>sp|HBBVAR003075 Hope; O(2) affinity down; unstable. dbSNP:rs33949486
KVVADVANALAHKY
>sp|HBBVAR003076 Brockton; unstable. dbSNP:rs33919821
KVVAGVPNALAHKY
>sp|HBBVAR003077 Geelong; unstable. dbSNP:rs33910475
KVVAGVADALAHKY
>sp|HBBVAR003078 Hinsdale; O(2) affinity down. dbSNP:rs34240441
KVVAGVAKALAHKY
>sp|HBBVAR025335 S-Wake; associated with V-6.
KVVAGVASALAHKY
>sp|HBBVAR003080 Himeji; unstable; O(2) affinity down. dbSNP:rs33927093
KVVAGVANDLAHKY
>sp|HBBVAR003081 St Jacques; O(2) affinity up. dbSNP:rs34980264
KVVAGVANTLAHKY
>sp|HBBVAR003082 Puttelange; polycythemia; O(2) affinity up. dbSNP:rs33927093
KVVAGVANVLAHKY
>sp|HBBVAR003083 Olmsted; unstable. dbSNP:rs35854892
KVVAGVANARA
>sp|HBBVAR003084 Ohio; O(2) affinity up. dbSNP:rs33921821
KVVAGVANALDHKY
>sp|HBBVAR003085 Rancho Mirage. dbSNP:rs33929415
KVVAGVANALADKY
>sp|HBBVAR003087 Syracuse; O(2) affinity up. dbSNP:rs33918338
KVVAGVANALAPKY
>sp|HBBVAR003086 Little Rock; O(2) affinity up. dbSNP:rs36020563
KVVAGVANALAQKY
>sp|HBBVAR003088 Abruzzo; O(2) affinity up. dbSNP:rs33918338
KVVAGVANALARK
>sp|HBBVAR003089 Mito; O(2) affinity up. dbSNP:rs33964352
KVVAGVANALAHEYH
>sp|HBBVAR003090 Rainier; O(2) affinity up. dbSNP:rs35117167
KVVAGVANALAHKCH
>sp|HBBVAR003091 Bethesda; O(2) affinity up. dbSNP:rs33949869
KVVAGVANALAHKHH
>sp|HBBVAR003092 Hiroshima; O(2) affinity up. dbSNP:rs33961444
KVVAGVANALAHKYD
>sp|HBBVAR003093 Cowntown; O(2) affinity up. dbSNP:rs33954264
KVVAGVANALAHKYL
>sp|HBBVAR003094 York; O(2) affinity up. dbSNP:rs33954264
KVVAGVANALAHKYP
>sp|HBBVAR003095 Kodaira; O(2) affinity up. dbSNP:rs33985739
KVVAGVANALAHKYQ

```