

## Artigo

**Hemoglobinas AS/Alfa talassemia - importância diagnóstica**

Renata Tomé-Alves<sup>1</sup>  
Daniela P. Marchi-Salvador<sup>1</sup>  
Giselda M. Orlando<sup>2</sup>  
Luciana A. Palharini<sup>1</sup>  
Rodrigo E. Imperial<sup>3</sup>  
Paulo C. Naoum<sup>4</sup>  
Claudia R. Bonini-Domingos<sup>4</sup>

Portadores de traço falciforme (hemoglobina AS) associados a talassemia alfa apresentam alterações na morfologia dos eritrócitos, normalmente ausentes nos heterozigotos para esta variante de hemoglobina. A interação entre hemoglobina S e talassemia alfa tem sido descrita como um dos fatores responsáveis pela melhora no quadro clínico de portadores homozigotos de hemoglobina S (anemia falciforme), diminuindo os episódios de crises de falcização. Os mecanismos genéticos desta influência são avaliados em análises moleculares dos genes da globina humana. Com o objetivo de verificar a presença de talassemia alfa em portadores de hemoglobina S em heterozigose, com presença de anemia, encaminhados ao Laboratório de Hemoglobinas do Departamento de Biologia da UNESP, de São José do Rio Preto, analisamos 1.002 amostras de sangue com traço falciforme, no período de 1990 a 1998. As amostras foram colhidas com EDTA como anticoagulante, após prévia autorização dos portadores. Para o diagnóstico laboratorial as amostras de sangue foram submetidas a procedimentos eletroforéticos em pH alcalino e ácido e pesquisa citológica de hemoglobina H. Os procedimentos eletroforéticos confirmaram a presença de hemoglobina AS. A pesquisa citológica evidenciou a presença de talassemia alfa. Deste total analisado, 16 (1,59%) amostras de sangue apresentaram a associação entre hemoglobina AS e alfa talassemia, sendo que duas eram de indivíduos de uma mesma família. Os resultados obtidos nos direcionaram a sugerir aos laboratórios de rotina que realizem a pesquisa de alfa talassemia entre os portadores de hemoglobina AS, com presença de anemia, para verificar a interação com talassemia alfa, fornecendo assim aos portadores informação importante sobre seu perfil hematológico.  
Rev.bras.hematol.hemoter., 2000, 22(3): 388-394

**Palavras-chave:** Hemoglobinopatias, diagnóstico, interação Hb As/alfa talassemia

**Introdução**

A Hemoglobina S é a mais comum das alterações hematológicas hereditárias conhecidas no homem (1). É causada por mutação no gene beta da globina, produzindo alteração estrutural na molécula, onde há troca de uma base nitrogenada do códon GAG para

GTG, resultando na substituição do Ácido Glutâmico pela Valina na posição de número 6 (2, 3). Os eritrócitos com a variante de hemoglobina S (Hb S) sofrem processo de falcização, fisiologicamente provocado pela baixa tensão de oxigênio, acidose e desidratação. As células falcizadas passam então a apresentar a forma de foice ou de lua

1 - Curso de Ciências Biológicas - UNESP- São José do Rio Preto- SP

2 - Curso de Ciências Biológicas Modalidade Médica - UNESP - Botucatu

3 - Biomédico - Laboratório de Hemoglobinas - UNESP- São José do Rio Preto - SP

4 - Departamento de Biologia - Laboratório de Hemoglobinas - UNESP - São José do Rio Preto - SP

Trabalho desenvolvido no Laboratório de Hemoglobinas, Departamento de Biologia, UNESP, São José do Rio Preto, SP

**Correspondência para:** Dra. Claudia Regina Bonini-Domingos  
Laboratório de Hemoglobinas, Departamento de Biologia – UNESP  
Rua Cristóvão Colombo, 2265. São José do Rio Preto. SP. CEP: 15054-000

crescente, com conseqüências variáveis em seu portador, dependentes da quantidade de hemoglobina S. A presença de hemoglobina Fetal no eritrócito com hemoglobina S oferece proteção a esta célula, contra o processo de falcização, pois não interage com hemoglobina S quando esta se precipita (1, 2, 3).

O traço falciforme caracteriza o portador assintomático, heterozigoto para Hb S, representado laboratorialmente por Hb AS. Os portadores não apresentam a doença, nem possuem anormalidades no número e forma de hemáceas, geralmente evidenciados por análises de rotina (1, 2). Por outro lado no estado de homozigose, (Hb SS) chamado também *anemia falciforme*, as alterações clínicas e hematológicas são bem evidentes (1, 3).

A denominação talassemia abrange um grupo heterogêneo de distúrbios genéticos da síntese de hemoglobina, caracterizado por redução na produção de uma ou mais cadeias polipeptídicas de globina, que resulta no desenvolvimento de anemia microcítica e hipocrômica (1, 2, 4).

Indivíduos normais possuem quatro genes responsáveis pela produção de globinas alfa. Análises por técnicas de hibridização mostraram que os quatro genes alfa encontram-se dois em cada no cromossomo 16. As formas de talassemia alfa são resultantes da deficiência de um, dois, três ou quatro genes alfa (5, 6). Seus portadores são caracterizados segundo o número de genes afetados em: portador silencioso (um gene alfa afetado); talassemia alfa heterozigota (dois genes alfa afetados); Doença de hemoglobina H (três genes alfa afetados) e Síndrome de Hidropsia Fetal por Hemoglobina Bart's (quatro genes alfa afetados) (6, 2).

Com a realização de estudos moleculares demonstrou-se que vários defeitos genéticos podem provocar a talassemia alfa e que, dependendo da extensão da lesão e do número de genes afetados, a síntese de globina alfa está diminuída, podendo apresentar ausência total da globina em questão. Como resultado deste desequilíbrio na síntese das globinas alfa e beta, o excesso de globina beta, que continua sendo sintetizada normalmente, forma tetrâmetros, resultando na Hb H (7, 4, 6).

É importante destacar que as talassemias do tipo alfa podem ter duas causas: hereditária

e adquirida. Evidentemente as formas hereditárias são as mais comuns e atingem, pelo menos, 4% da população brasileira. As formas adquiridas são geralmente secundárias a um processo patológico primário (8, 2, 9).

A possibilidade de interação entre hemoglobinas variantes e talassemias interferirem no curso clínico da anemia falciforme vem sendo examinada extensivamente na literatura (10, 11, 12, 13). Na anemia falciforme (Hb SS), a presença de talassemia alfa associada, níveis variáveis de hemoglobina fetal, assim como a herança de diferentes haplótipos do gene da globina beta S, têm sido considerados como fatores determinantes da gravidade clínica da doença (14, 12, 10). A interação da hemoglobina S (HbSS) com talassemia alfa promove uma melhora do quadro clínico do portador em comparação com a anemia falciforme (2, 13). Relatos da literatura demonstram que em pacientes portadores desta interação (Hb SS/alfa tal.), ocorre diminuição da anemia hemolítica, inibição da polimerização intracelular da hemoglobina S e diminuição da intensidade de hemólise (15, 13).

Os benefícios advindos da presença de talassemia alfa, dos diversos haplótipos do *cluster* da globina beta, dos níveis de hemoglobina fetal no curso clínico, e sua influência nos parâmetros hematológicos e bioquímicos em pacientes com anemia falciforme, embora intensamente analisados, ainda são controversos (16, 13).

Com o objetivo de verificar a presença de talassemia alfa em portadores de hemoglobina S em heterozigose (Hb AS) com quadro anêmico, realizou-se o presente estudo.

### Casuística e Métodos

O material utilizado para atingir o objetivo proposto foi sangue periférico coletado com anticoagulante (EDTA 5%). As amostras de sangue foram colhidas após autorização para utilização em pesquisa, segundo normas do Comitê de Ética e Pesquisa da UNESP. Ao chegarem ao Laboratório de Hemoglobinas, foram codificadas e submetidas a testes de triagem e de confirmação para hemoglobinas anormais.

Os métodos utilizados para triagem de hemoglobinas anormais foram: Resistência

Osmótica em solução de Cloreto de Sódio a 0,36% (17); Eletroforese em pH alcalino em acetato de celulose (18); Análise da morfologia eritrocitária (2). Para confirmação diagnóstica utilizou-se: Pesquisa de Corpos de Heinz e Agregados de Hemoglobina H (19); Eletroforese em pH ácido (20); Dosagem de Hemoglobina A<sub>2</sub> (18); Dosagem de Hemoglobina Fetal (21). A eletroforese em pH ácido foi realizada também, com o gel de agar para hemoglobina ácida da CELM, com excelentes resultados.

## Resultados

No período de 1990 a 1998, foram encaminhadas ao Centro de Referência de Hemoglobinas da UNESP, para pesquisa de hemoglobinopatias, amostras de sangue com anemia a esclarecer. Através da triagem de hemoglobinas anormais, 1.002 amostras de sangue apresentaram traço falciforme (Hb AS). Deste total, 16 (1,59%) apresentaram interação Hb AS/alfa talassemia, sendo que dois indivíduos

eram da mesma família. A tabela 1 ilustra os dados obtidos para cada um dos 16 portadores.

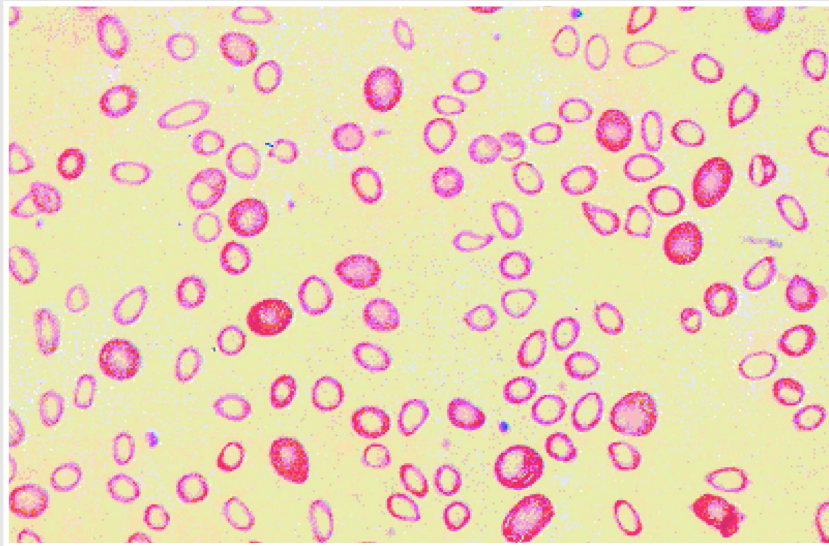
O traçado eletroforético para Hb AS apresentava em algumas situações, associação com Hb H, com valores variáveis entre 2 a 5% em eletroforese. As frações de Hb H eram facilmente visíveis nos primeiros minutos de eletroforeses, no pH alcalino. Observamos esta interação em seis (37,5%) dos casos analisados.

A morfologia eritrocitária da maioria (75%) dos casos de interação Hb AS/alfa talassemia observados, apresentou-se alterada, com padrões de microcitose e hipocromia variando de discretos a moderados. A figura 1 ilustra a análise morfológica com alteração moderada dos eritrócitos observada em um dos casos analisados.

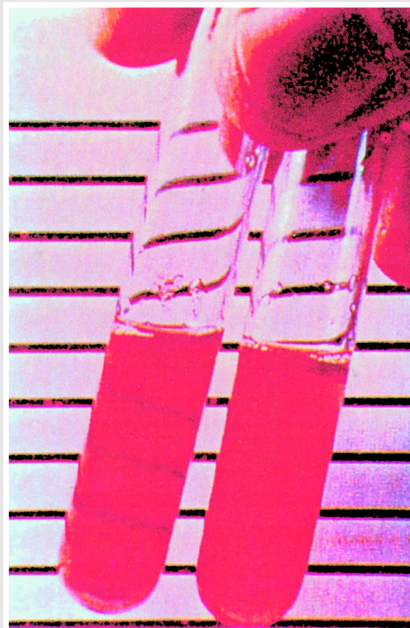
A Resistência osmótica em solução de cloreto de sódio a 0.36%, utilizada como teste de triagem para talassemias do tipo beta heterozigota (17), foi positiva em 12 (75%) casos. A figura 2 ilustra uma análise com testes positivo e negativo para esta triagem.

**Tabela 1.** Dados obtidos para cada um dos 16 portadores de interação Hb S/ alfa talassemia

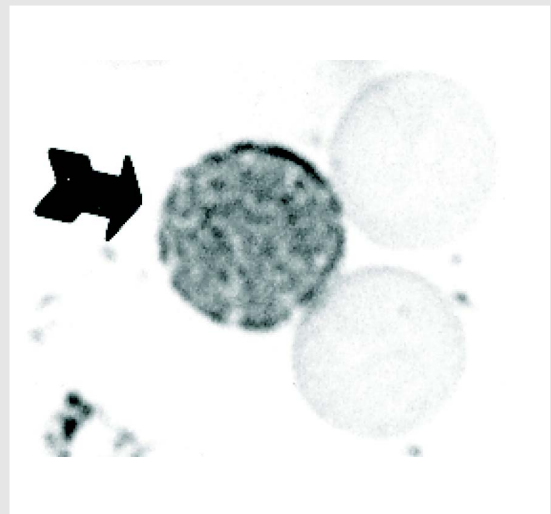
Nº de Identificação	Eletroforese	Microscopia Eritrocitária	NaCl (0.36%)	Descendência	Azul Cresil Brilhante
01	AS + H	+	Positivo	Negróide	Positivo
02	AS	N	Positivo	Negróide	Positivo
03	AS	+	Negativo	Caucasóide	Positivo
04	AS + H	++	Positivo	Caucasóide	Positivo
05	AS	++	Positivo	Negróide	Positivo
06	AS + H	++	Positivo	Caucasóide	Positivo
07	AS	++	Positivo	Caucasóide	Positivo
08	AS	N	Negativo	Caucasóide	Positivo
09	AS + H	+++	Positivo	Caucasóide	Positivo
10	AS	+	Negativo	Caucasóide	Positivo
11	AS	+	Positivo	Caucasóide	Positivo
12	AS + H	++	Positivo	Caucasóide	Positivo
13	AS	+	Negativo	Caucasóide	Positivo
14	AS	++	Positivo	Caucasóide	Positivo
15	AS + H	N	Positivo	Caucasóide	Positivo
16	AS	N	Positivo	Caucasóide	Positivo



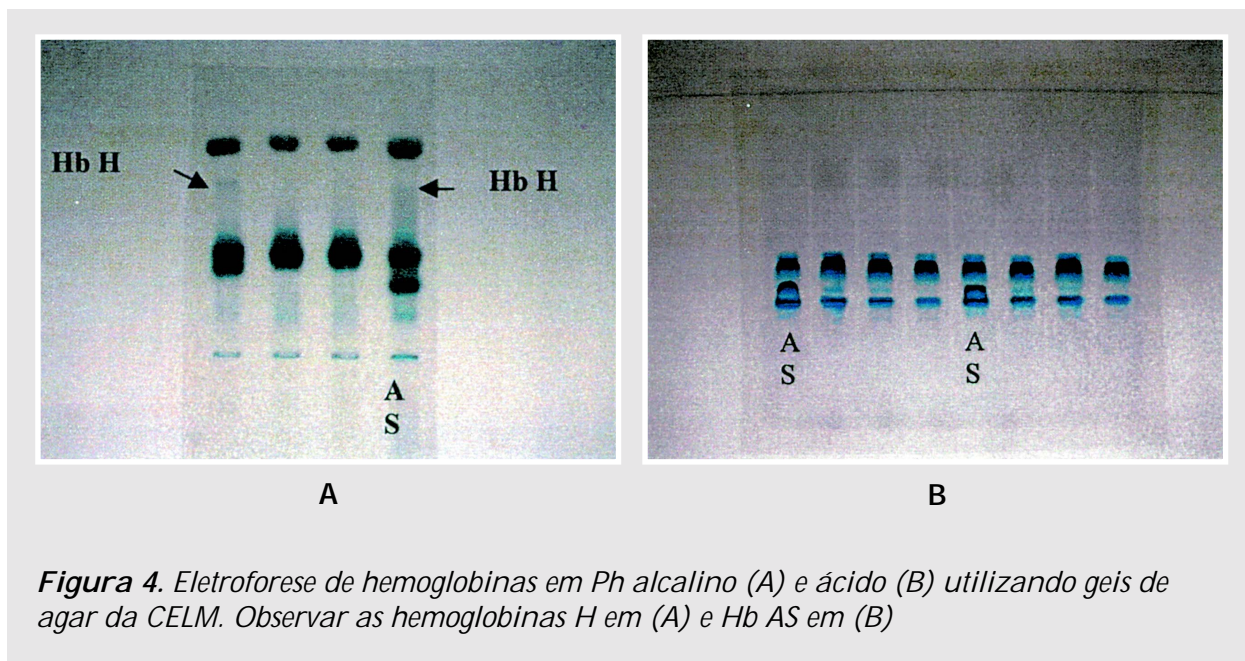
**Figura 1.** Ilustração de esfregaço sangüíneo apresentando alterações morfológicas moderadas dos eritrócitos



**Figura 2.** Resistência Globular osmótica em solução de NaCl a 0,36%. O tubo de ensaio número 1 representa um resultado negativo para este teste, e o tubo 2, um positivo



**Figura 3.** Visualização de precipitados de hemoglobina H, após coloração com Azul de Crezil Brilhante a 1%



**Figura 4.** Eletroforese de hemoglobinas em Ph alcalino (A) e ácido (B) utilizando geis de agar da CELM. Observar as hemoglobinas H em (A) e Hb AS em (B)

## Discussão

Morfologia eritrocitária alterada e Resistência osmótica em solução de NaCl 0.36% positiva não são resultados esperados para portadores de Hb AS. Esta ocorrência nos levou a suspeitar de possíveis interações com talassemia alfa ou ferropenia, que deveriam ser melhor avaliadas. Através da realização de testes de triagem como os citados, podemos suspeitar da interação de Hb AS/alfa talassemia. No entanto, as confirmações tanto para a hemoglobina AS, quanto para a alfa talassemia devem ser realizadas. A Hb AS pode ser confirmada por procedimentos eletroforéticos em pH ácido, onde as hemoglobinas que apresentam migração semelhante em pH alcalino podem ser diferenciadas (2), e a talassemia alfa, confirmada por pesquisa citológica específica (19, 2, 9). Todas as suspeitas de alfa talassemia foram confirmadas pela pesquisa intraeritrocitária de Hb H em amostras coradas com Azul de Crezil Brilhante a 1%, cujos corpos de precipitação podem ser visualizados na figura 3. Nos casos estudados afastamos suspeitas de ferropenia por avaliação do ferro sérico e ferritina.

A figura 4 ilustra procedimentos eletroforéticos em pH alcalino e ácido. Para

visualização de Hb H é aconselhável a macro aplicação da amostra, o que facilita sua visualização nos primeiros minutos de eletroforese. A confirmação de Hb AS deve ser realizada por procedimentos eletroforéticos em pH ácido, e suportes como o gel fornecido pela CELM apresentam resultados com rapidez e segurança.

Com relação à origem racial dos indivíduos analisados portadores da interação, apenas três (18.75%) apresentaram características negróides e o restante - 13 (81.25%), eram de origem caucásoides com descendência italiana e espanhola principalmente.

As avaliações da literatura sobre interação Hb S/alfa talassemia dizem respeito à anemia falciforme (Hb SS), ou seja, à forma homozigota da herança do gene afetado, onde a talassemia atua como modulador, melhorando o quadro de anemia do (13, 16).

Em nosso estudo, observamos a necessidade de pesquisar a presença de talassemias do tipo alfa, nos portadores de traçado eletroforético compatível com Hb AS, mas com morfologia eritrocitária semelhante aos observados em talassêmicos. A deficiência de ferro deve ser afastada. Estudos desta natureza fornecem subsídios para o conhecimento da distribuição deste genótipo na população, e realização de um diagnóstico laboratorial mais preciso.

## Conclusões

Nos indivíduos com perfil eletroforético compatível com Hb AS, e dados hematológicos de anemia discreta, deverão ser avaliadas as interações com alfa talassemia, após afastar ferropenia.

A análise cuidadosa do traçado eletroforético em pH alcalino permite a visualização de bandas de Hb H, sugerindo alfa talassemia. A confirmação da suspeita de alfa talassemia deve ser realizada de forma cuidadosa e com a utilização de diferentes metodologias.

A pesquisa de quadros interativos de variantes de hemoglobinas e talassemias fornece subsídios para o conhecimento da diversidade genética destas alterações em nossa população, e possibilita ampliar o conhecimento sobre o perfil hematológico dos portadores.

As metodologias aplicadas são de fácil reprodutibilidade, sendo facilmente aplicadas aos laboratórios de rotina.

## Hemoglobins AS/alpha thalassemia: diagnostic importance

*Renata Tomé-Alves, Daniela P. Marchi-Salvador, Giselda M. Orlando, Luciana A. Palharini, Rodrigo E. Imperial, Paulo C. Naoum, Claudia R. Bonini-Domingos*

### Abstract

*Sickle Cell disease is a generic term for a group of genetic disorders characterized by the predominance of hemoglobin S. These disorders include Sickle Cell anemia, the Sickle Cell beta Thalassemia syndromes, and Hemoglobinopathies in which hemoglobin S is in association with another abnormal hemoglobin, such as hemoglobin S/C. The Sickle Cell trait (hemoglobin AS) associated with Alpha Thalassemia presents alterations in the red blood cells morphology, usually absent in the heterozygous for this hemoglobin variant. The interaction between hemoglobin S and alpha Thalassemia has been described as one of the factors responsible for the improvement in the clinical picture of homozygous of hemoglobin S (Sickle Cell Anemia), decreasing the number of episodes of pain. The genetic mechanisms of this influence are evaluated using molecular analyses of the*

*human globin genes. With the objective of verifying the presence of alpha Thalassemia in heterozygous of hemoglobin S, with anemia, sent to the Laboratory of Hemoglobins, Department of Biology, UNESP, São José do Rio Preto, SP, we analyzed 1002 blood samples with Sickle Cell trait, in the period from 1990 to 1998. The samples were picked with EDTA 5% as anticoagulant, after previous authorization of the carriers. Appropriated counseling and management requires definitive diagnosis. For the laboratorial diagnosis the blood samples were submitted to electrophoretic procedures in alkaline and acid pH and cytological evaluation of hemoglobin H. The electrophoretic procedures confirmed the presence of hemoglobin AS. The cytological evaluation evidenced the presence of alpha Thalassemia. Of this total analyzed, 16(1,59%) blood samples presented the association between hemoglobin AS and alpha Thalassemia and two individuals belonged of the same family. Our results addressed us to suggest to the routine laboratories, that is important to accomplish the research of alpha Thalassemia among the Sickle Cell trait, with anemia, to verify the interaction with alpha Thalassemia, supplying to the carriers a important information on its hematological profile, genetic pattern of hemoglobinopathies and the appropriated counseling.*

*Rev. bras. hematol. hemoter., 2000, 22(3): 388-394*

**Key words:** Hemoglobinopathies, diagnosis, sickle cell trait, alpha thalassemia

## Referências Bibliográficas

1. Naoum, P.C. *Eletroforese, Técnicas e Diagnósticos*. 2.ed. São Paulo: **Editores Santos**, 1999.
2. Bonini-Domingos, C.R. *Prevenção das hemoglobinopatias no Brasil: diversidade genética e metodologia laboratorial*. São José do Rio Preto, 1993. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista.
3. Edelstein, S.J. *The sickled cell: from myths to molecules*. Cambridge: Harvard University Press, 1996.

4. Weatherall, D.J., Clegg, J.B. *The Thalassemia Syndromes*. 3ed. **Blackwell Scientific Publications**, 1981.
5. Lehmann, H., Huntsman, R.G. *Man's haemoglobin*. Amsterdam: North Holland, 1974.
6. Naoum, P.C. & Bonini-Domingos, C.R. *Talassemias alfa*. **LAES & HAES**, n. 113, 70-98, 1998.
7. Naoum, P.C. *Hemoglobinopatias e Talassemias*. São Paulo: **Sarvier**, 1997.
8. Weatherall, D.J. *Fortnightly review - the thalassaemias*. **B.M.J.**, v. 314, p.1675-78, 1997.
9. Bonini-Domingos, C.R. *Prevalência de hemoglobinas anormais, fenótipos de haptoglobinas e quantificação de hemoglobinas A2 e Fetal em portadores de Doença de Chagas*. São José do Rio Preto, 1990. 143 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista - UNESP.
10. Jackson, J.F.; Odom, J.L.; Bell, W.N. *Amelioration of sickle cell disease by persistent fetal hemoglobin*. **JAMA** v.177, p. 867-871, 1961.
11. Powars, D.R. *Natural history of sickle cell disease – the first ten years*. **Semin. Hematol.** v. 12; p. 267-285, 1975.
12. Schroeder, W.A. *The human gama-chain variants. A review Hemoglobin*. v.6, n.1 p. 513-515, 1977.
13. Silva-Lima, J.C. *Interação de anemia falciforme e alfa talassemia. Aspectos moleculares, clínicos, hematológicos e bioquímicos – um estudo na população brasileira*. Rio de Janeiro, 1997. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Instituto de Biologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro.
14. Nogushi, C.T.; Rodgers, G.P.; Serjeant, G.R.; Schechter, A.W. *Levels of fetal hemoglobin necessary for treatment of sickle cell disease*. **N. Engl. J. Med.** v. 313 p. 96, 1988.
15. Higgs, D.R.; Aldridge, B.E.; Lamb, J.; Clegg, J.B.; Weatherall, D.J.; Mayes, R.J.; Grandison, Y.; Lowrie, Y.; Mason, K.P.; Serjeant, B.E.; Serjeant, G.R. *The interaction of alpha-thalassemia and homozygous sickle cell disease*. **New Engl. J. Med.** v. 1306 p. 1441-1446, 1982.
16. Powars, D.R.; Chan, L.S.; Schroeder, A. *The variable expression of sickle cell disease is genetically determined*. **Semin. Hematol.** v.27 p. 360-376, 1990.
17. Silvestroni, E., Bianco, I. *Screening for microcytemia in Italy: analysis of data collected in the past 30 years*. **Am. J. Human Genet**, v.27, p.198, 1975.
18. Marengo-Rowe, A.J. *Rapid electrophoresis and quantitation of hemoglobin on cellulose acetate*. **J. Clin Pathol.**, v.18, p.790-792. 1965.
19. Papayannopoulos, R., Stamatayannopoulos, G. *Stains for Inclusion Bodies*. In: Standardization of laboratory reagents and methods for detection of haemoglobinopathies. Atlanta: **Hew Plublications**, 1974.
20. Vella, F. *Acid agar electrophoresis of human hemoglobin*. **Am. J. Clin. Pathol**, v.49, p.440, 1968.
21. Betke, K., Marti, N.R., Schlicht, I. *Estimation of small percentages of foetal hemoglobin*. **Nature**. v.184, p.1877, 1959.

Recebido: 09/02/2000

Aceito: 15/08/2000