

## **DOENÇAS QUE ELEVAM A Hb FETAL**

**Paulo Cesar Naoum**

Biomédico, Professor Titular pela UNESP, Ex-assessor científico da OMS para hemoglobinopatias na América Latina, diretor da Academia de Ciência e Tecnologia de São José do Rio Preto, SP.

### **Introdução**

A hemoglobina Fetal, ou Hb F, tem importância essencial na fisiologia da distribuição de oxigênio durante a fase fetal que abrange o período entre o terceiro mês de gestação até o dia do nascimento. Nos dois primeiros meses de gestação, os eritrócitos dos embriões humanos têm três tipos de hemoglobinas conhecidas coletivamente por hemoglobinas embrionárias e identificadas pelas diferenças moleculares de suas globinas em Hb Gower-1 ( $\zeta_2/\epsilon_2$ ), Hb Gower-2 ( $\alpha_2/\epsilon_2$ ) e Hb Portland ( $\zeta_2/\gamma_2$ ), conforme mostra a figura 1. Essas hemoglobinas são sintetizadas por genes específicos em diferentes fases da evolução embrionária e com especificidades próprias para efetuarem rápidas trocas de oxigênio com tecidos que se modificam constantemente<sup>(8)</sup>.

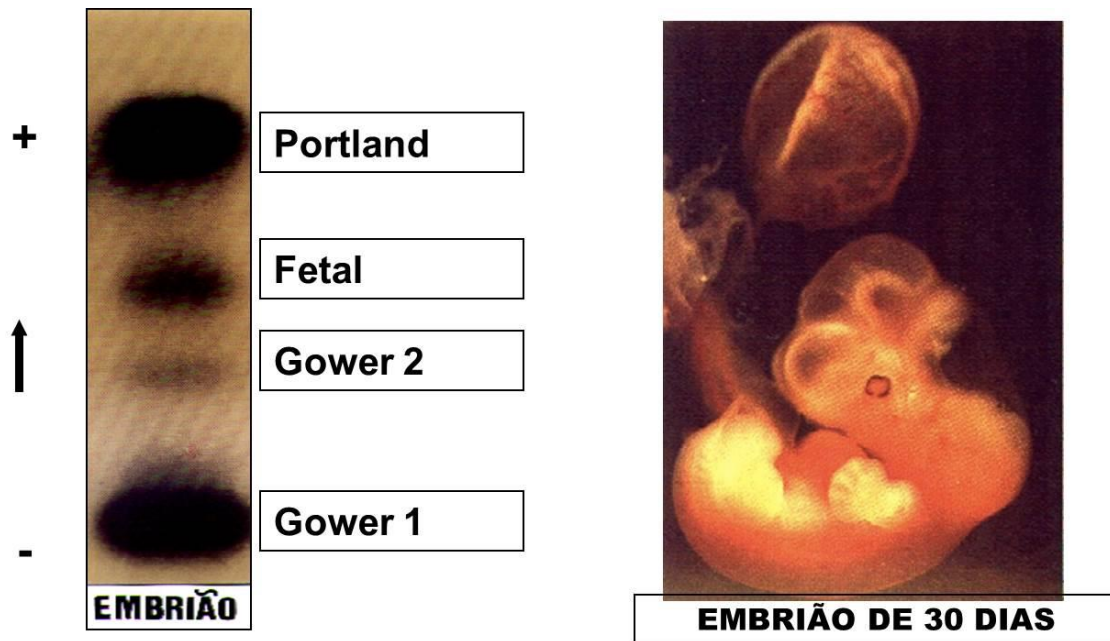
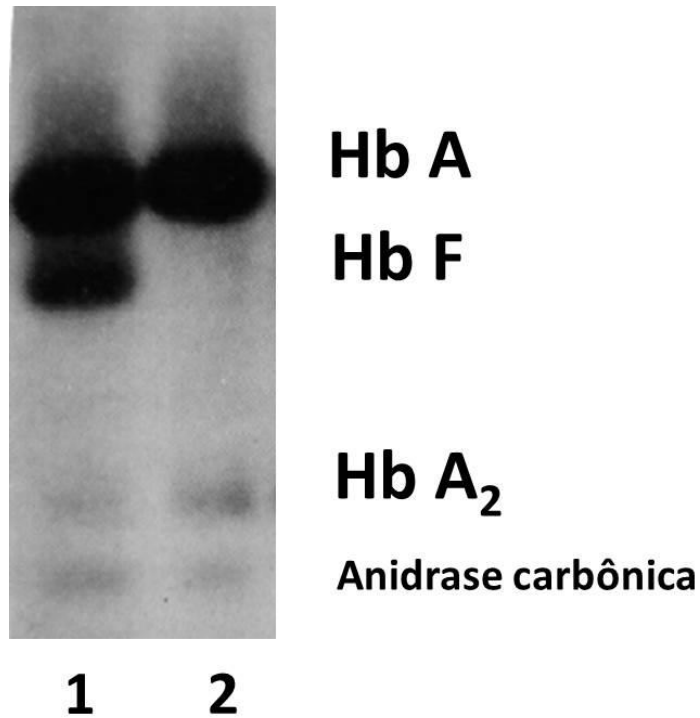


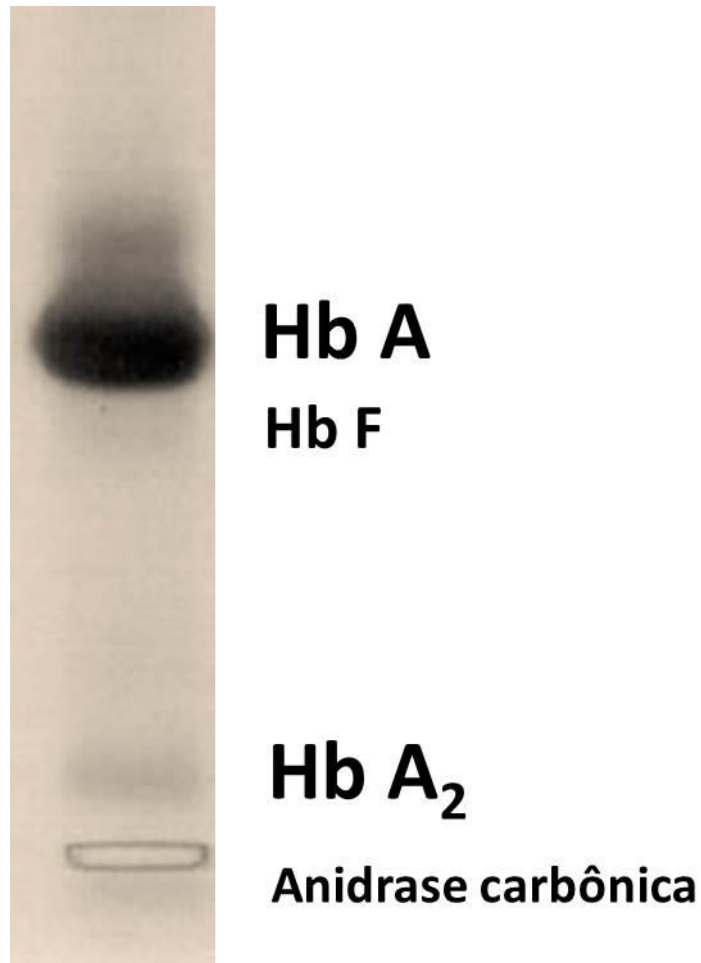
Figura 1 – Eletroforese em acetato de celulose com tampão alcalino de sangue de embrião de aproximadamente dois meses. Nesta fase é possível visualizar o início da síntese de Hb F e as três hemoglobinas embrionárias: Hb Portland, Gower-1 e Gower-2.

Assim, quando a estrutura anatômica e fisiológica do feto se torna definida a partir do terceiro mês de gestação, as hemoglobinas embrionárias são substituídas integralmente pela Hb F. A principal razão fisiológica para essa mudança de tipos de hemoglobinas se deve a duas causas, a primeira, devido ao fato do expressivo crescimento da massa corporal que necessita de constância na suplementação de oxigênio, e a segunda, por causa da restrição de oxigênio ofertado pela circulação materno-fetal. Para superar o baixo teor de oxigênio que chega para o feto, o processo evolutivo dos mamíferos, notadamente o da espécie humana, desenvolveu a Hb F que tem como principal característica fisiológica a alta afinidade pelo oxigênio, que faz com que a liberação de oxigênio dos eritrócitos para os tecidos fetais seja lenta. A estrutura molecular da Hb F é composta por duas globinas alfa e duas gama ( $\alpha_2\gamma_2$ ) e sua concentração atinge entre 90 e 95% até o nascimento. Entretanto, a partir do sexto mês do desenvolvimento do feto ocorre também, mas de forma muito discreta, as sínteses das hemoglobinas normais A ( $\alpha_2\beta_2$ ) e A<sub>2</sub> ( $\alpha_2\delta_2$ ), de tal forma que ao nascer as suas concentrações não ultrapassam 10% e 2%, respectivamente. O nascimento provoca no organismo do recém-nascido uma brusca interrupção genética para a

síntese de Hb F e um rápido estímulo para a produção de Hb A, e como o processo da eritropoiese medular demora por volta de oito dias, essas variações somente serão perceptíveis a partir da primeira semana de vida do bebê<sup>(8,3)</sup>. Mas de forma geral, o padrão normal para as hemoglobinas de um recém-nascido na primeira semana é o seguinte: Hb F (90 a 95%), Hb A (5 a 10%) e Hb A<sub>2</sub> (0,5 a 2%)<sup>4</sup>. Num bebê com 30 dias de vida, por exemplo, é possível visualizar que a concentração da Hb F decresce e a da Hb A se eleva, conforme mostra a figura 2. Como a substituição das sínteses de globinas gama da Hb F por globinas beta da Hb A ocorre gradualmente, esse processo pode demorar entre dois e cinco meses. Dessa maneira, o padrão definitivo dos tipos e das concentrações de hemoglobinas para bebês é estabelecido a partir dos cinco meses de vida, conforme se segue: Hb A (96 a 98%), Hb A<sub>2</sub> (2 a 4%) e Hb F (0 a 1%)<sup>(5)</sup>. A figura 3 mostra um fracionamento de hemoglobinas normais em um bebê com seis meses de idade.



**Figura 2- Eletroforese de hemoglobinas em agarose com tampão alcalino. (1) Fracionamento de hemoglobinas um recém-nascido com 30 dias de vida (Hb AF) que apresenta 30% de concentração de Hb F e Hb A<sub>2</sub> abaixo de 2%. (2) Fracionamento de hemoglobinas normais (Hb AA) com concentrações normais de Hb A, Hb A<sub>2</sub> e Hb F. Em ambos, também, observa-se a enzima anidrase carbônica presente em todos hemolisados eritrocitários.**



**Figura 3 – Eletroforese de hemoglobinas em agarose com tampão alcalino. Fracionamento de hemoglobinas em um bebê com cinco meses de idade. As concentrações das hemoglobinas estão dentro das faixas de normalidades: Hb A (96 a 98%), Hb F (0 a 1%) e Hb A<sub>2</sub> (2 a 4%).**

Por fim, em pessoas com idade acima de seis meses, se a Hb F apresentar valores de concentração acima de 1% é possível supor que e possam ser portadoras de talassemia beta ou de persistência hereditária de Hb F<sup>(4)</sup>, conforme mostra a figura 4.

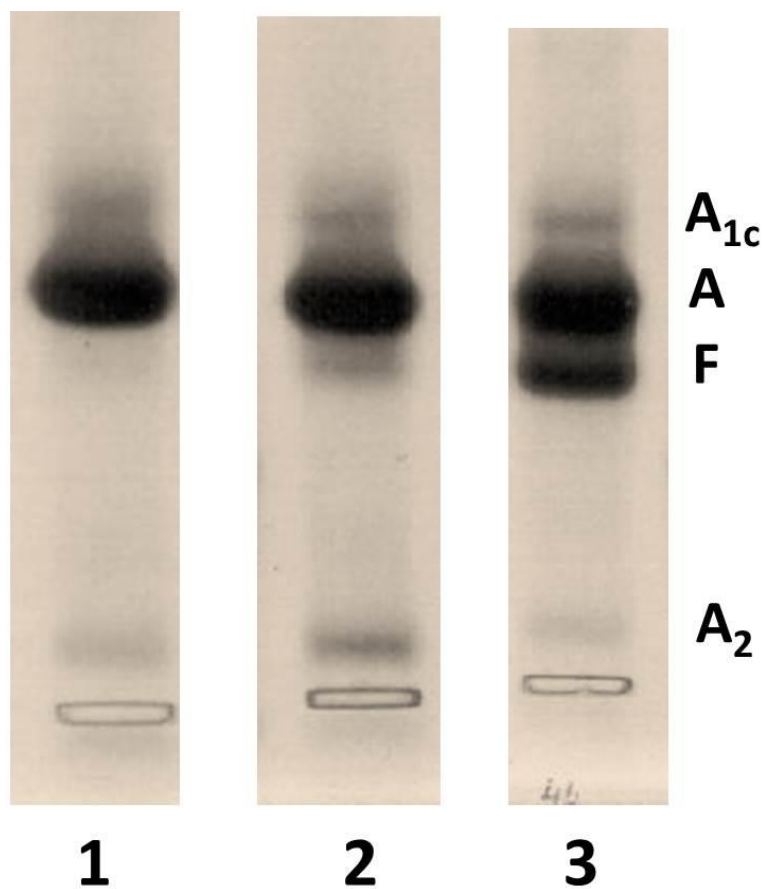


Figura 4 – Eletroforeses de hemoglobina em agarose com tampão alcalino.(1) Fracionamento normal de hemoglobinas; a Hb F está com concentração abaixo de 0,5%. (2) Hb F com 3,5% de concentração em um caso de talassemia beta menor; observe que a Hb A<sub>2</sub> também está elevada quando comparada com a eletroforese de fracionamento normal à esquerda. (3) Hb F com 18% de concentração em um caso de persistência hereditária de Hb F (PHHF). Em todas as três eletroforeses é possível visualizar a fração de hemoglobina glicada (Hb A<sub>1c</sub>) dentro de parâmetros normais.

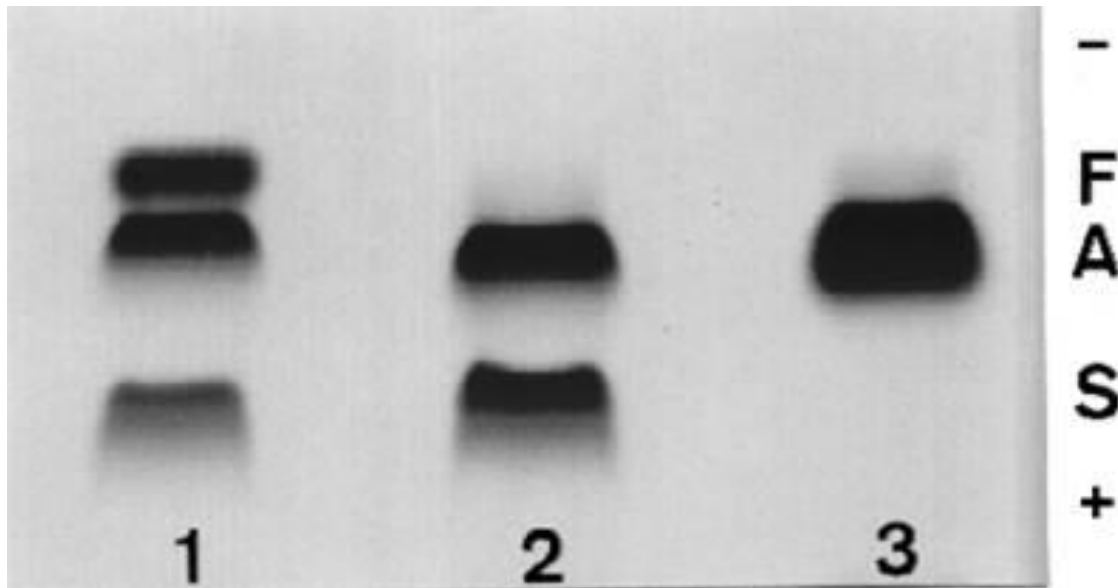
#### **Avaliações laboratoriais da Hb F**

A Hb F pode ser avaliada quantitativamente e qualitativamente. As análises quantitativas são as mais comuns e podem ser realizadas por meio de três testes diferentes: dosagens bioquímicas, eletroforeses e cromatografia por HPLC. Por outro lado, a análise qualitativa é realizada por um tipo de teste, a citologia intra-eritrocitária da Hb F, que determina se apenas alguns eritrócitos tem Hb F (distribuição

heterogêna de Hb F) ou se todos eritrócitos as tem (distribuição homogênea da Hb F).

Dosagens bioquímicas: há dois métodos, o de Singer<sup>(7)</sup> para concentrações acima de 10% de Hb F e o de Betke<sup>(2)</sup> para concentrações abaixo de 10%, ambos são conhecidos como teste de *resistência alcalina para hemoglobina fetal*. Os dois métodos com excelentes graus de sensibilidade e reprodutibilidade técnicas estão fundamentados na capacidade química da Hb F ser resistente à desnaturação quando submetida à solução alcalina de NaOH 0,2N. As hemoglobinas A, S, C, entre outras, não são resistentes às soluções alcalinas e se desnaturam com facilidade. Pelo fato desses testes serem trabalhosos e com várias etapas de reações, os mesmos foram excluídos da rotina laboratorial e substituídos pelas eletroforeses ou cromatografia HPLC. Apesar disso tem sido úteis em pesquisas científicas.

Eletroforeses<sup>(6)</sup>: há três tipos: alcalina, ácida e focalização isoelétrica. Todas fornecem ótimos resultados de fracionamento da Hb F e permitem que as mesmas sejam dosadas por densitometria ótica. A eletroforese alcalina é o método mais usado na rotina e pesquisa laboratorial de hemoglobinopatias e, também, para avaliação quantitativa de Hb F. O método é fundamentado na separação das frações de hemoglobinas através de suas cargas elétricas. A Hb F, por exemplo, é discretamente menos negativa em relação à Hb A, conforme mostrado nas figuras 1 a 4, e sua análise merece especial atenção quando comparada com outras hemoglobinas que se posicionam mais distantes da Hb A. A eletroforese ácida se desenvolve em agarose confeccionada com tampão pH 6,2 e separa as hemoglobinas através da carga elétrica associada ao intenso grau de eletroendosse (reação das proteínas da agarose com as cargas elétricas das hemoglobinas). Por essa razão, a cadeia polipeptídica gama da Hb F interage intensamente com as proteínas da agarose, e esse conjunto molecular é “empurrado” para frente da HbA, tornando a Hb F mais rápida que a Hb A (figura 5).



**Figura 5 – Eletroforese de hemoglobinas em agarose ácida. (1) Sangue de bebê com um mês de idade portador de Hb ASF; nesta idade a Hb F ainda está presente em altas concentrações. (2) Sangue de pessoa adulta portadora de Hb AS. (3) Sangue de pessoa normal para hemoglobinas, ou Hb AA. Observe que em (1) a Hb F tem mobilidade mais rápida que a Hb A. Em (2) e (3) a Hb F está presente em baixíssimas concentrações (traços de Hb F), fato considerado normal.**

A eletroforese por focalização isoelétrica (IFE) tem alto custo/benefício devido aos seus equipamentos e reagentes importados (agarose especial, anfólitos, catalizadores, etc.). A IFE tem a característica físico-química de fracionar diferentes tipos de hemoglobinas conforme seus pontos isoelétricos que, ao encontrar correspondência com a faixa de pH do anfólito usado, as tornam imobilizadas e se precipitam no gel (focalização\*). A figura 6 mostra o fracionamento de hemoglobinas por IFE. *\*termo “focalização” foi usado pelos autores da primeira publicação científica da técnica de eletroforese de focalização isoelétrica. O correto seria “imobilização”, porém a palavra “focalização” tornou-se cientificamente popular.*



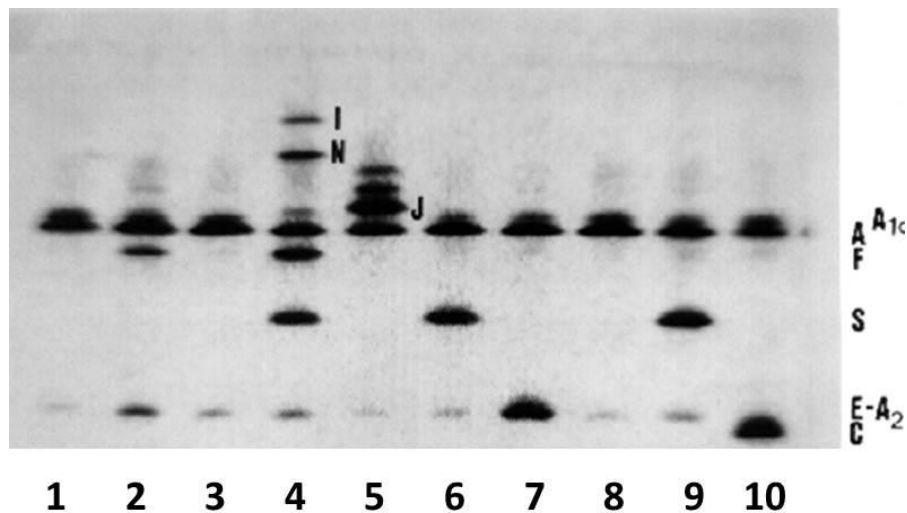


Figura 6 – Eletroforese de hemoglobinas em focalização isoelétrica. (1), (3) e (8) hemoglobinas normais ou Hb AA; (2) talassemia beta menor com elevações de Hb A<sub>2</sub> e Hb F; (4) e (5) amostras padrões de alguns tipos de hemoglobinas variantes; (6) e (9) Hb AS; (7) Hb AE; (10) Hb AC.

**Cromatografia HPLC<sup>(6)</sup>:** é um método cromatográfico cuja resina de preenchimento da coluna de aço é misturada com líquido tamponado é submetido a alta pressão física. Nesse sentido, ocorre a eluição de várias frações de hemoglobinas que interagem com os compostos químicos da resina, inclusive a Hb F. As frações de hemoglobinas são eluidas e registradas em gráfico na sequência da eluição, conforme mostra a figura 7. Apesar de ter excelente grau de sensibilidade e reprodutibilidade técnica, o alto custo do equipamento e de reagentes restringe o seu uso para a maioria dos laboratórios que atuam em análises clínicas.

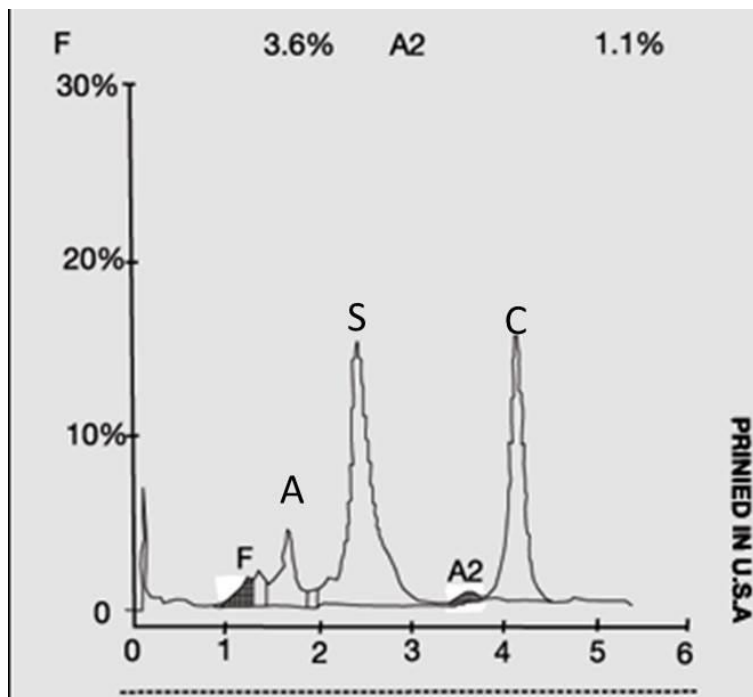


Figura 7 – Cromatografia HPLC de hemoglobinas. O fracionamento das hemoglobinas ocorre por eluição e seus valores são registrados no gráfico. O cromatograma destaca a Hb F e a Hb A<sub>2</sub> em sangue de pessoa com doença falciforme (Hb SC) e que recebeu transfusão de hemácias normais (Hb A).

Citologia intraeritrocitária de Hb F: é um método fundamentado na resistência da Hb F quando submetida a solução fortemente ácida (pH 3). A técnica original foi descrita por Kleihauer<sup>(4)</sup> mas modificada ao longo do tempo. O teste é feito em esfregaços com sangue fresco e fixados com metanol. Em seguida, os esfregaços em estudos são mergulhados em vasilha contendo tampão ácido por alguns segundos e, na sequência, são corados com eritrosina ou azul de metileno. Eritrócitos contendo Hb F tornam-se corados, e a relação entre intensidade de fixação de cor e concentração de Hb F é diretamente proporcional à presença desta hemoglobina. Há três situações de resultados: *negativo*

(nenhum eritrócito tem Hb F em quantidades suficientes para corar o eritrócito), *positivo heterogênio* (quando há eritrócitos não corados juntamente com eritrócitos corados) e *positivo homogêneo* (quando todos os eritrócitos estão corados). A figura 8 mostra o exemplo da distribuição positiva heterogênea de Hb F. A disposição heterogênea de Hb F é comum em talassemias do tipo beta, enquanto que a disposição homogênea ocorre na persistência hereditária de Hb F (PHHF).

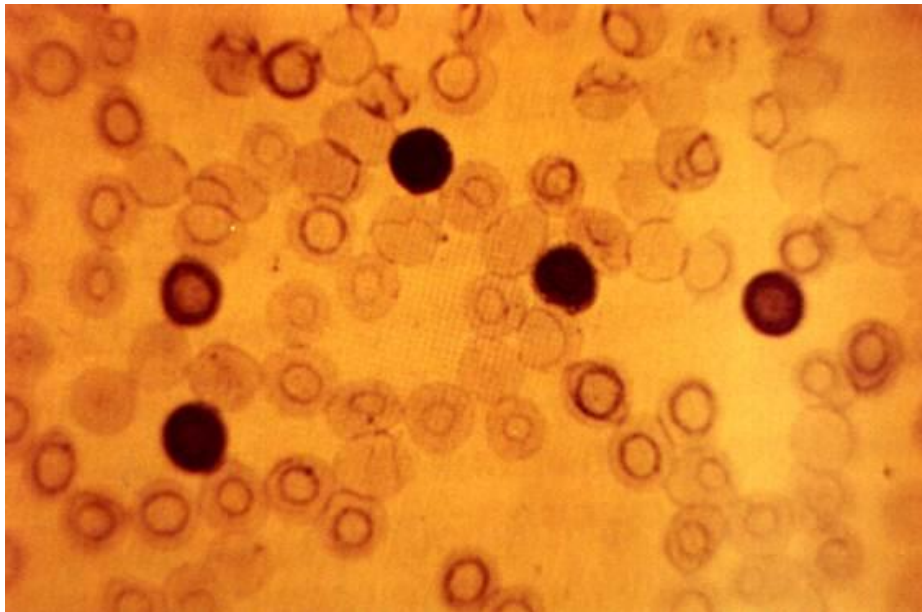


Figura 8 – Pesquisa citológica da distribuição intraeritrocitária de Hb F. A positividade neste sangue pertencente a uma pessoa com talassemia beta heterozigota é heterogênea. Observe que há apenas cinco eritrócitos corados pela presença de Hb F, enquanto que o restante dos eritrócitos sem Hb F não se coraram.

### **Patologias relacionadas com a elevação de Hb F**

Os principais objetivos de avaliar quantitativamente a Hb F estão relacionados com quatro importantes situações: (1) talassemias beta (menor, intermédia e maior); (2) doença falciforme, (3) persistência hereditária de Hb Fetal ou PHHF; (4) contaminação de sangue fetal na gestante. A tabela 1 resume situações indicativas de patologias, notadamente de talassemias e doença falciforme, além de outras não associadas a patologias mas que tem elevações de Hb F<sup>(1)</sup>.

**Tabela 1 – Relações entre elevações de Hb F e possíveis associações com patologias das hemoglobinas (talassemias e doenças falciforme) e situações fisiológicas (recém-nascidos e PHHF).**

| <b>Hb F</b>                  | <b>&lt;1%</b> | <b>1 – 5%</b>     | <b>5 – 15%</b>    | <b>15 – 45%</b>   | <b>45 – 90%</b>   | <b>90 – 100%</b> |
|------------------------------|---------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|------------------|
| Hb AA <sup>(1)</sup>         | +             | -                 | -                 | -                 | -                 | -                |
| Tal.β menor <sup>(2)</sup>   | +             | +                 | -                 | -                 | -                 | -                |
| Tal.β interm. <sup>(3)</sup> | -             | -                 | +                 | +                 | -                 | -                |
| Tal.β maior <sup>(4)</sup>   | -             | -                 | -                 | + <sup>(5)</sup>  | + <sup>(6)</sup>  | + <sup>(7)</sup> |
| Hb S/Tal.β <sup>(8)</sup>    | -             | -                 | + <sup>(9)</sup>  | + <sup>(10)</sup> | + <sup>(11)</sup> | -                |
| Hb SS-SF <sup>(12)</sup>     | +             | + <sup>(13)</sup> | + <sup>(13)</sup> | + <sup>(14)</sup> | -                 | -                |
| AF <sup>(15)</sup>           | -             | + <sup>(16)</sup> | + <sup>(16)</sup> | + <sup>(17)</sup> | -                 | -                |

**1 - Resultado normal**

**2 - O diagnóstico laboratorial da Talassemia β menor ou heterozigota é realizado por meio da dosagem de Hb A<sub>2</sub> que se mostra elevada em 95% dos casos.**

**3 - A Talassemia intermédia é uma designação médica e fundamentada na clínica e nos exames laboratoriais básicos (hemograma, eletroforese de hemoglobina, morfologia eritrocitária, reticulócitos, etc.).**

**4 - A maior prevalência dos casos de Talassemia β maior é por deleção total do gene β (β<sup>0</sup>), ou deleção parcial do gene β (β<sup>+</sup>). Dessa forma há três combinações básicas: β<sup>0</sup>β<sup>0</sup> (ou homozigota beta zero), β<sup>0</sup>β<sup>+</sup> (heterozigota dupla beta+/ beta<sup>0</sup>) e β<sup>+</sup>β<sup>+</sup> (ou homozigota beta +). Excepcionalmente ocorre deleções totais dos genes β e δ, produzindo a talassemia maior do tipo β<sup>0</sup>δ<sup>0</sup>/β<sup>0</sup>δ<sup>0</sup>.**

**5 - Geralmente ocorre na Talassemia beta maior dos tipos β<sup>+</sup>β<sup>+</sup> e β<sup>0</sup>β<sup>+</sup>.**

**6 - Geralmente ocorre na Talassemia beta maior dos tipos β<sup>0</sup>β<sup>+</sup> (Hb F < 80%) e β<sup>0</sup>β<sup>0</sup> (Hb F = 80-90%).**

**7 - Geralmente ocorre na talassemia beta maior do tipo β<sup>0</sup>δ<sup>0</sup>/β<sup>0</sup>δ<sup>0</sup>.**

8 - A associação entre Hb S e Talassemia beta (Hb S/ $\beta$ Tal.) pode ser de dois tipos: Hb S/ $\beta^0$ Tal. e Hb S/ $\beta^+$ Tal. Pessoas com Hb S/ $\beta^0$ Tal. não tem Hb A e a Hb S tem maior concentração que a Hb F (HbS>HbF), enquanto que a Hb A<sub>2</sub> pode estar normal ou aumentada. Pessoas com Hb S/ $\beta^+$ Tal. tem Hb A em menor concentração que a Hb S, além de Hb F (HbS>HbA>HbF) e a Hb A<sub>2</sub> pode estar normal ou aumentada. Nos dois tipos de HbS/Tal. $\beta$  os valores de HCM do eritrograma estão diminuídos.

9 - Geralmente ocorre no tipo de HbS/Tal. $\beta^+$ .

10- Geralmente ocorre no tipo de HbS/Tal. $\beta^0$ .

11- Situação rara em que a Hb F supera 45% no tipo de HbS/Tal. $\beta^0$ .

12- Hb SS representa a anemia falciforme. Pessoas com esta doença pode ter ausência de Hb F, ou presença de Hb F que pode estar associada a tratamento com hidroxiuréia (HU) ou com persistência hereditária de Hb F (PHHF).

13- Situações que ocorrem em pacientes tratados com HU ou que tenham associação com PHHF (HbSS/PHHF).

14- Situações que ocorrem somente em pessoas com HbSS/PHHF.

15- Excluindo talassemia beta (menor, intermédia ou maior) a Hb AF passa a ser considerada como associação entre Hb A e PHHF, que pode ter concentrações variadas de Hb F.

16- Hb AF – a PHHF é do tipo heterozigota, Hb F abaixo de 15%.

17- Hb AF – a PHHF é do tipo homozigota, Hb F acima de 15%.

## **Conclusões**

É importante destacar que, embora as aplicações dos métodos acima mencionados estejam bem estabelecidas conforme seus procedimentos padrões, é fundamental que se considere a suspeita clínica do paciente avaliado, agregado dos resultados do eritrograma, incluindo os índices hematimétricos VCM e HCM, bem como a análise da morfologia

eritrocitária. Com todos esses parâmetros é possível emitir o laudo laboratorial.

### **Referências bibliográficas**

1- Bauer DE, Kamron SC, Orkin SH – Reawaking fetal hemoglobin: prospects for new therapies for the beta-globins disorders. *Blood*, 120: 2945-2953, 2012.

2- Betke K, Marti HR, Schlicht L – Estimation of small percentage of foetal haemoglobin. *Nature*, 184: 1877, 1959.

3- Etoh D, Antwi-Bosaiko C, Amuzu D – Fetal hemoglobina during infancy and sickle cells adults. *Afr Health Sci*, 6: 51-54, 2006.

4- Kleihauer E – Determination of fetal hemoglobin: elution technique. In *Practical Haematology*. Eds. Sir John Dacie and SM Lewis. Churchill Livingstone Publisher, 1995.

5- Naoum PC – Hemoglobinopatias e Talassemias. Ed. Sarvier, São Paulo, 1997, 171 p.

6- Naoum PC – Eletroforeses: hemoglobinopatias, proteínas séricas, lipoproteínas e DNA. Editora GEN (Grupo Editorial Nacional), São Paulo, 2012, 301 p.

7- Singer K, Chernoff AI – Studies on abnormal hemoglobins. Their demonstration in sickle cell anemia and other hematological disorders by means of álcali denaturation. *Blood*, 6: 413-428, 1951.

8- Stomatoyannopoulos G – Control of globin gene expression. During development and erythroid differentiation. *Exp Hematol*, 33: 259-271, 2005.