

## DOENÇAS QUE ELEVAM A CONCENTRAÇÃO DA Hb FETAL

**Paulo Cesar Naoum**, biomédico, Professor doutor, livre-docente e titular pela UNESP. Professor e diretor científico 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 de embriões humanos tem três tipos de hemoglobinas conhecidas coletivamente por hemoglobinas embrionárias e identificadas por suas diferenças químicas e moleculares em Hb Gower-1 ( $\alpha_2\epsilon_2$ ), Hb Gower-2 ( $\zeta_2\gamma_2$ ) e Hb Portland ( $\zeta_2\delta_2$ ). Esses três tipos de hemoglobinas são próprias para a fase embrionária, quando acontecem inúmeras modificações orgânicas e fisiológicas que necessitam de rápidas trocas de oxigênio com tecidos. Assim, quando a estrutura anatômica e fisiológica do feto se torna definida a partir do terceiro mês de gestação, as hemoglobinas embrionárias se tornam dispensáveis, uma vez que a partir dessa fase o feto necessitará de moléculas de hemoglobinas que realizam trocas de oxigênio de forma lenta, e essa hemoglobina é a F. É por essa razão que as hemoglobinas embrionárias são substituídas pela Hb F ( $\alpha_2\gamma_2$ ). Entretanto, essas substituições envolvem complexos mecanismos genéticos de desativação de genes das globinas embrionárias ( $\zeta$ ,  $\epsilon$  e  $\gamma$ ) e ativação do gene  $\gamma$  da hemoglobina F, conforme representa os esquemas da **figura 1**. Portanto, no feto o gene da globina  $\gamma$  inicia a síntese de Hb F no final dos dois meses de desenvolvimento embrionário cujas concentrações são quase imperceptíveis por técnicas não moleculares, mas gradualmente atinge 95 a 100% de concentração entre o quarto e sétimo mês de gestação. Ao chegar ao oitavo mês de gestação, próximo, ao nascimento, os genes

das globinas beta e delta começam a ser lentamente estimulados a sintetizarem respectivamente as hemoglobinas A e A<sub>2</sub>, enquanto que na mesma intensidade o gene da globina  $\gamma$  sofre repressão em sua expressão de síntese. Finalmente, ao nascer, o recém-nascido ainda apresenta altos níveis de Hb F (45 a 90%), mas a Hb A está presente com concentrações entre 10 e 50%, além da presença de traços de Hb A<sub>2</sub> (< 2%), conforme mostra a **figura 2**. O nascimento, como se sabe, produz um efeito fisiológico motivado pela disponibilidade ambiental do oxigênio capaz de modificar intensamente a ação dos genes que participam da síntese genética das hemoglobinas F, A e A<sub>2</sub>. A interferência que o oxigênio ambiental exerce na regulação desses genes sínteses é conhecido por *efeito epigenético*. Essa

modificação na estimulação dos genes da globina beta ocorre porque a fisiologia da oxigenação é mais eficaz com as moléculas de Hb A do que em relação às moléculas de Hb F que tem maior afinidade ao oxigênio e demora para libera-lo. A adaptabilidade genética do efeito epigenético da oxigenação das células, tecidos e órgãos, determina as alterações de sínteses genéticas das hemoglobinas A, A<sub>2</sub> e Fetal ao longo dos cinco meses após o nascimento. Tecnicamente é possível avaliar essas mudanças fisiológicas e genéticas por meio das quantificações das concentrações das hemoglobinas F, A e A<sub>2</sub>, conforme mostra o exemplo da tabela 1.

Tabela 1- Exemplo do efeito epigenético da disponibilidade ambiental do oxigênio na síntese de hemoglobinas F, A e A<sub>2</sub> a partir do nascimento e nos cinco meses seguintes até sua estabilização em crianças com tipos normais de hemoglobinas.

Dias de vida após o nascimento	Concentrações de hemoglobinas (*)		
	Hb F (%)	Hb A (%)	Hb A <sub>2</sub> (%)
Primeira semana	40 - 90	10 - 50	< 2
Primeiro mês	20 - 40	60 - 80	2 - 3
Terceiro mês	5 - 10	90 - 95	2 - 3
Quarto mês	< 5	96 - 98	2 - 4
Quinto mês em diante	< 1	96 - 98	2 - 4

(\*) As concentrações apresentadas representam exemplos de diversas avaliações descritas na literatura científica. Excluindo os valores do quinto mês, que são tidos como padrões e valem por toda a vida, os referentes entre o

primeiro e quarto mês podem ter algumas variações em crianças com hemoglobinas 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 intraeritrocitária da Hb F, que determina se apenas alguns eritrócitos tem Hb F (distribuição heterogênea de Hb F) ou se todos eritrócitos as tem (distribuição homogênea da Hb F).

Dosagens bioquímicas: há dois métodos, o de Singer ( ) para concentrações acima de 10% de Hb F e o de Betke ( ) para concentrações abaixo de 10% e ambos são conhecidos como testes de *resistência alcalina para hemoglobina*. 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 às soluções alcalinas. A Hb A, Hb A<sub>2</sub>, Hb S, Hb C, etc. 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 para demonstrações em aulas práticas.

Eletroforeses: há três tipos: alcalina, ácida e focalização isoeletrica. Todas fornecem ótimos resultados de fracionamento da Hb F e permitem que as mesmas sejam dosadas por densitometria ótica. A eletroforese alcalina está fundamentada na separação da Hb F por meio de sua carga elétrica que é discretamente menos negativa em relação à Hb A ( ). A eletroforese ácida, por sua vez, separa a Hb F da Hb A através do intenso grau de eletroendosse que ocorre entre a Hb F e as proteínas da agarose, e essa inter-relação química a torna mais rápida na eletroforese que a Hb A ( ). A eletroforese por focalização isoeletrica (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 pHs específicos, e quando seus fracionamentos coincidem com a faixa de pH formada no gel de agarose cada fração se precipita e não se move da posição. Entretanto, a eletroforese alcalina é mais usada na rotina e pesquisa laboratorial pela facilidade de execução técnica e pelo baixo custo. As **figuras 3<sup>a</sup>, 3b e 3c** mostram os três tipos de eletroforeses com fracionamentos de Hb F e outras hemoglobinas.

Cromatografia HPLC: é um método cromatográfico em coluna de aço cuja resina de preenchimento da coluna é misturada com líquido tamponado é submetido a alta pressão física, resultando na eluição fracionada de várias

frações de hemoglobinas, inclusive a Hb F ( ). Os resultados obtidos por meio desse procedimento fornecem excelentes graus de sensibilidade e reprodutibilidade técnicas (figura 4). Porém, devido aos altos custos do equipamento e da reposição de colunas, seu uso é restrito a laboratórios de apoio e de pesquisas científicas.

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 ( ) 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 o 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. Há três situações de resultados: negativo (nenhum eritrócito tem Hb F em quantidades suficientes para corar), positivo heterogêneo (quando há eritrócitos não corados juntamente com eritrócitos corados) e positivo homogêneo (quando todos os eritrócitos estão corados). As figuras 4<sup>a</sup>, 4b e 4c mostram as três situações: ausência de Hb F, distribuição heterogênea de Hb F e distribuição homogênea de Hb F. A análise da distribuição de Hb F intraeritrocitária auxilia a diferenciar, por exemplo, duas amostras com Hb S pertencentes a diferentes pacientes. O paciente portador de Hb S com distribuição homogênea indica que a Hb S está associada provavelmente à Persistência Hereditária de Hb F (Hb S/PHHF), enquanto que o paciente portador de Hb S com distribuição heterogênea indica que a Hb S está associada provavelmente à Talassemia Beta ( Hb S/Tal.Beta). Entretanto, atualmente, a citologia intraeritrocitária de Hb F tem sido muito importante para avaliar o grau de contaminação de sangue fetal na gestante. Esta é uma situação peculiar, pois o sangue do feto ao refluir em direção à circulação materna é indicativo de anormalidade gestacional. Dessa forma, pesquisa-se a presença de eritrócitos com Hb F no sangue retirado da gestante, cuja coloração é sempre do tipo de distribuição homogênea. Nesses casos, os médicos podem solicitar a quantificação percentual da presença de eritrócitos com Hb F em 1000 eritrócitos e, assim, ter uma avaliação mais precisa do grau de contaminação.

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

Os principais objetivos de avaliar quantitativamente a Hb F estão relacionados com cinco importantes situações: talassemias beta (menor, intermédia e

maior), persistência hereditária de Hb Fetal (por exemplo, pessoas assintomática com Hb AF , ou pessoas com anemia falciforme branda com genótipo de Hb SF), avaliação da Hb F em pessoas com doença falciforme que são tratadas com hidroxiuréia (HU), avaliar o índice de Hb F em recém-nascido e, por fim, avaliar o grau de contaminação de sangue fetal na gestante. A tabela 2 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.

Tabela 2 – Relações entre elevações de Hb F e possíveis associações com patologias das hemoglobinas (talassemias e doenças falciforme) e situações fisiológicas (recém-nascidos e PHHF).

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

- 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- Na maioria dos casos a Talassemia β maior pode ser 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.
- 16- Hb AF – a PHHF é do tipo heterozigota.
- 17- Hb AF – a PHHF é do tipo homozigota.

## Conclusões

É importante destacar que, embora as aplicações dos métodos acima mencionados estejam bem estabelecidas conforme seus procedimentos padrões, os resultados de suas execuções técnicas mostrados na tabela 2 não são suficientes para emitir o laudo de diagnóstico de hemoglobinopatias. Para essa finalidade é fundamental que se considere a suspeita clínica e que se agregue também os resultados dos eritogramas, incluindo os índices hematimétricos VCM e HCM, bem como a análise da morfologia eritrocitária.