

### III SEMINÁRIO

---

**Tema: PATOLOGIA MOLECULAR DA HEMOGLOBINA**

**Subtemas:**

- Estrutura da hemoglobina e transporte de oxigénio
- Síntese de hemoglobina durante o desenvolvimento fetal
- Generalidades sobre as hemoglobinas anormais
- Anemia de células falciformes
- Carboxi-hemoglobina
- Talassémias

**Intervenientes**

- Docentes Convidados:
    - Dra. Maria João Costa (Interna do I. Geral/HSM)
    - Dra. Maria José Ferreira (Interna do I. Geral/HSM)
  - Docente do Instituto de Bioquímica/FML:
    - Dr. João Paulo Guimarães (Monitor do Instituto de Bioquímica e Interno do Internato Geral/HSM)
  - Investigador Voluntário
    - Dr. Mário Carreira (Interno do I. Geral/HSM)
  - Aluno do 2.º ano, monitor voluntário do Instituto de Bioquímica/FML
    - Luís Sargento
-

## ESTRUTURA DA HEMOGLOBINA E TRANSPORTE DE OXIGÉNIO

*João Paulo Guimarães*

A hemoglobina é a proteína que tem como principal função o transporte de oxigénio dos pulmões para os tecidos, ao mesmo tempo que facilita a eliminação do  $\text{CO}_2$  em sentido inverso.

A parte proteica da molécula de hemoglobina (globina) é composta por quatro cadeias polipeptídicas: duas cadeias  $\alpha$  com 141 aminoácidos cada, e duas cadeias  $\beta$  com 146 aminoácidos. Embora as cadeias  $\alpha$  e  $\beta$  tenham diferentes sequências de aminoácidos a sua estrutura tridimensional é muito semelhante.

Cada uma destas cadeias contém um grupo prostético (o heme) ao qual se liga o oxigénio. O heme, anel porfirínico tetrapirrólico cujo núcleo contém ferro sob a forma de  $\text{Fe}^{2+}$  (ferroso), é o pigmento que dá a cor vermelha ao sangue.

A sequência de aminoácidos que compõe cada uma das cadeias de hemoglobina é bem conhecida há vários anos. Apesar das quatro cadeias não serem iguais, elas dispõem-se umas em relação às outras como os vértices de um tetraedro, embora não totalmente regular. A hemoglobina é uma molécula quase esférica, com peso aproximado de 65.000 dalton, e cujas dimensões são de aproximadamente  $640 \times 550 \times 500 \text{nm}$ . De uma forma geral pode dizer-se que as regiões interiores das cadeias são compostas principalmente por aminoácidos hidrofóbicos e que à superfície existem aminoácidos com cadeias hidrofílicas, o que torna a molécula de hemoglobina impermeável, embora solúvel em água.

A quantidade de oxigénio ligado à hemoglobina em determinado momento relaciona-se com a concentração de oxigénio (ou melhor, com a pressão parcial de oxigénio,  $\text{PO}_2$ , visto tratar-se de um gás; quando a pressão é referida ao sangue arterial é expressa por  $\text{P}_a\text{O}_2$ ). O número de moléculas de oxigénio que se ligam aos grupos heme da hemoglobina aumenta à medida que a concentração de oxigénio no meio sobe e, pelo contrá-

rio, diminui quando a pressão parcial de oxigénio baixa.

O equilíbrio entre a hemoglobina e o oxigénio representa-se facilmente através de um gráfico – onde se indica em ordenadas a saturação da hemoglobina (percentagem da capacidade total máxima de ligação de oxigénio) e em abcissas a pressão parcial de oxigénio (em mmHg) – que é vulgarmente designado por curva de dissociação da hemoglobina. Tal como se define a afinidade das enzimas para os seus substratos, também se pode considerar a afinidade da hemoglobina para o oxigénio. Um outro conceito frequentemente usado é o da  $\text{P}_{50}$ , que corresponde à pressão de oxigénio com a qual se obtém uma saturação de 50%.

A curva de dissociação da oxihemoglobina é uma curva sigmóide; a níveis mínimos de  $\text{PO}_2$  a molécula capta pouco oxigénio; aproximadamente a partir dos 30mmHg a captação de oxigénio atinge o aumento máximo. Em termos práticos, este fenómeno favorece o transporte de oxigénio: a altas pressões de oxigénio (ex: pulmão,  $\text{PO}_2 \approx 100 \text{mmHg}$ ) a molécula capta muito oxigénio (saturação de 90-95%), enquanto a níveis de  $\text{PO}_2$  da ordem dos 40mmHg (ex: no sector venoso dos tecidos periféricos) a tendência da hemoglobina é estar apenas cerca de 75% saturada, o que significa que libertou o “excesso” de oxigénio nos tecidos que foram irrigados.

O formato sigmóide da curva de dissociação da oxihemoglobina corresponde a um efeito de interacção entre as subunidades, designado por efeito cooperativo. Pode ser interpretado da seguinte forma: quando uma molécula de hemoglobina capta oxigénio, favorece a captação de oxigénio pelas outras cadeias, e quando perde oxigénio aumenta também as probabilidades de libertação de oxigénio pelas outras cadeias da mesma molécula. A explicação actual para o efeito cooperativo envolve conceitos mais sofisticados, em grande parte derivados de uma teoria introduzida por Jacques Monod e Jean-Pierre Changeux – a clássica teoria do alosterismo. Assim, considera-se a existência de duas modalida-

des conformacionais para as quatro cadeias de hemoglobina, às quais corresponderiam diferentes afinidades para o oxigénio. Estes dois estados conformacionais da hemoglobina designam-se por R (forma “relaxada” ou laxa) e T (forma tensa), interconvertíveis entre si, correspondendo a duas diferentes modalidades de ligação intercadeias; a diferentes constantes de equilíbrio para o oxigénio, a forma R tem uma afinidade muito superior à da forma T.

A curva de dissociação da oxihemoglobina é afectada pela tendência que a hemoglobina apresenta para a interconversão entre a forma T e R. Como as condições do meio podem provocar alterações no sentido de favorecer a passagem de uma forma à outra, resulta que a forma da curva de dissociação da oxihemoglobina varia com a composição do meio. Os factores mais importantes são a concentração de protões (que define o pH do meio), a pressão de dióxido de carbono ( $\text{PCO}_2$ ) e a concentração de 2,3-bisfosfoglicerato (2,3-BPG). Estes factores tendem a estabilizar a forma T, ou seja, aumentando a concentração de qualquer deles diminui a afinidade para o oxigénio. O resultado é uma curva de dissociação da oxihemoglobina deslocada para a direita, mais sigmóide. A temperatura (obviamente dentro das variações fisiológicas) também desloca a curva de dissociação para a direita, embora a torne menos sigmóide. Há deslocamento da curva para a esquerda quando diminui a  $[\text{H}^+]$ , a  $\text{PCO}_2$ , a [2,3-BPG] ou quando baixa a temperatura.

O efeito do pH sobre a curva de dissociação (desvio da curva para a direita com a diminuição do pH) não se esgota no efeito de estabilização da forma T. Há outros mecanismos independentes da transição entre formas T e R. É conhecido que a hemoglobina pode captar e libertar protões de e para o meio, funcionando como tampão. Cedo se verificou também que esta troca de protões com o meio estava intimamente relacionada com a captação e libertação de oxigénio: quando capta oxigénio a hemoglobina liberta protões para o meio, e vice-versa. Há evidência experimental que

os protões em questão provenham de aminoácidos posicionados nos extremos das cadeias e não da vizinhança dos grupos heme. A situação pode ser também encarada sob outro ponto de vista: à captação de protões corresponde uma diminuição da afinidade da hemoglobina para o oxigénio. A este fenómeno de reciprocidade e interdependência entre a afinidade da hemoglobina para o oxigénio e para os protões chama-se efeito Bohr. O efeito Bohr encontra-se intimamente ligado ao transporte de  $\text{CO}_2$ . De facto, o  $\text{CO}_2$  proveniente da respiração dos tecidos é demasiado insolúvel no plasma para ser transportado apenas como tal, pelo que grande parte dele é transformado em ácido carbónico por acção de uma enzima eritrocitária – a anidrase carbónica. O ácido carbónico dissocia-se de imediato em ião bicarbonato e um hidrogenião (reacção espontânea). Esta reacção é das mais rápidas reacções bioquímicas conhecidas: uma só enzima pode catalisar até meio milhão de reacções por segundo. Contudo, na ausência de hemoglobina seria rapidamente inibida por excesso de protões produzidos. Isso só não acontece porque a hemoglobina se encarrega de captar esses protões, processo que, via efeito Bohr, diminui a afinidade para o oxigénio e favorece a libertação deste para os tecidos. Nos pulmões o processo inverte-se: a hemoglobina capta oxigénio e liberta protões, regenerando de novo o  $\text{CO}_2$ , que é libertado para os alvéolos pulmonares. Mas a participação da hemoglobina não se esgota neste processo: uma fracção significativa do  $\text{CO}_2$  é transportada directamente ligada à hemoglobina, após combinação do  $\text{CO}_2$  com grupos amina das cadeias de globina, com formação de compostos carbamino.

Outro factor que influencia de forma significativa o comportamento da hemoglobina é o 2,3-bisfosfoglicerato (2,3-BPG). Com efeito, desde o início dos estudos da função respiratória da hemoglobina se verificou que o comportamento desta era diferente consoante se encontrasse dentro ou fora dos glóbulos vermelhos: no interior do eritrócito a afinidade da hemoglobina para o  $\text{O}_2$  era sistemati-

camente menor, o que fazia prever a existência de uma substância intra-eritrocitária responsável por este efeito. Mais tarde descobriu-se que essa substância era um fosfato orgânico, posteriormente identificado como o 2,3-BPG, produzido num “desvio” da via glicolítica (via de Rappoport-Luebering). Esta substância provoca uma redução rápida na afinidade da hemoglobina para o oxigénio, sem contudo alterar o fenómeno de cooperatividade local onde o 2,3-BPG se liga parece ser uma cavidade central formada por resíduos de aminoácidos pertencentes às 4 cadeias. Essa cavidade fica acessível do exterior quando a molécula se encontra na forma T, isto é, quando é disponibilizado suficiente espaço entre as duas hélices H das cadeias  $\beta$ . Ao ligar-se neste local o 2,3-BPG estabelece pontes entre as duas cadeias  $\beta$ , o que estabiliza bastante bem a molécula na forma T.

Todos os processos de regulação acima mencionados são de extrema utilidade para a regulação do transporte de oxigénio para os tecidos, e só eles permitem que a oxigenação continue a processar-se em condições desfavoráveis, por exemplo, em situações de anemia, permanência em grandes altitudes ou em estados de  $\text{PaO}_2$  cronicamente baixa (hipoxémia crónica), de origem cardíaca ou pulmonar.

## SÍNTESE DA HEMOGLOBINA DURANTE O DESENVOLVIMENTO FETAL

*Luís Sargento*

A eritropoiese é o processo de síntese de eritrócitos. No adulto a eritropoiese ocorre na medula óssea a partir de uma célula estaminal pluripotente, que também dá origem às outras células sanguíneas. Há progressiva acumulação de hemoglobina no citoplasma da célula, ocorrendo depois a expulsão do núcleo e dos restos de organitos citoplasmáticos, formando-se o glóbulo vermelho maduro (adulto).

O glóbulo vermelho entra em circulação, onde tem um tempo médio de vida de cerca de 120 dias. As células velhas ou as células novas com defeito são captadas pelo sistema retículo-endotelial e aí degradadas.

## Abundância relativa dos diversos tipos de hemoglobina

No genoma humano existe informação para a síntese de diversos tipos de globina: alfa, beta, gama, epsilon e zeta. As três últimas, normalmente existem em muito pequena quantidade (Quadro I).

**Quadro I** – Hemoglobinas do adulto

Tipo	Constituição	Total relativo
Hb A	alfa2 beta2	97 a 99%
Hb F	alfa2 gama2	1 a 3%
Hb A <sub>2</sub>	alfa2 delta2	vestígios

## Síntese da hemoglobina durante o desenvolvimento fetal

A eritropoiese não ocorre sempre no mesmo local. As primeiras células com hemoglobina são produzidas no saco vitelino. Segue-se a activação da eritropoiese hepática, que é a fonte principal de eritrócitos durante o desenvolvimento fetal. Mais tarde inicia-se a eritropoiese esplênica e medular.

Cada um destes órgãos tem preferência pela síntese de determinados tipos de cadeia.

Durante o desenvolvimento fetal há grande produção de globina  $\alpha$  e  $\gamma$  (com predomínio da síntese de Hb F). Progressivamente há incremento da síntese de cadeias  $\beta$  e diminuição das cadeias  $\gamma$ , o que conduz ao aumento da percentagem de Hb A (Quadro II).

**Quadro II** – Hemoglobinas produzidas durante o desenvolvimento fetal

Estádio de desenvolvimento	Tipo de hemoglobina
Embrionário	Gower1, Gower2, Portland
Fetal	F e A

A existência de um tipo diferente de hemoglobina no feto está relacionada com o facto do

sangue fetal ser oxigenado a partir do sangue materno. Como aí a pressão do oxigénio é baixa, é necessária uma hemoglobina com afinidade maior para o oxigénio.

## DREPANOCITOSE

*Maria José Ferreira*

A drepanocitose, ou doença de células falciformes, foi pela primeira vez descrita em 1910 por James B. Herrick, após os ter observado num estudante negro. Este queixava-se de crises dolorosas recorrentes, febre, períodos de tosse e tonturas. Tinha anemia, úlceras de perna e estava icterico (coloração amarelada da pele por aumento de bilirrubina). Ao observar o sangue deste doente ao microscópio, Herrick verificou que alguns dos glóbulos vermelhos tinham a forma de um crescente, ou foice. Nasceu daqui a designação de “doença de células falciformes”, inspirada no aspecto morfológico dos glóbulos vermelhos.

Esta alteração dos glóbulos vermelhos é reversível e depende do conteúdo do sangue em oxigénio. Quando a concentração de oxigénio baixa, pode haver formação de células falciformes.

Verificou-se posteriormente que a base deste fenómeno era a existência de uma molécula anormal de hemoglobina, designada hemoglobina S, que migra mais lentamente do que a hemoglobina normal na electroforese. Nesta hemoglobina anormal, o ácido glutâmico da posição 6 da cadeia  $\beta$  da hemoglobina é substituído pela valina. Enquanto o ácido glutâmico tem carga negativa, a valina é neutra e hidrofóbica. Daqui resulta a tendência

para as moléculas de hemoglobina S aderirem entre si, formando polímeros que originam a distorção dos eritrócitos. Esta distorção em corpúsculos com a forma de foice, menos flexíveis, está na origem de obstruções do fluxo sanguíneo nos capilares, do aumento da viscosidade do sangue e da destruição globular precoce (hemólise). A obstrução dos capilares e o aumento da viscosidade aumenta a hipóxia de algumas áreas; estando a falciformação relacionada com a baixa de oxigénio, é criado um ciclo vicioso: a falciformação agrava a hipóxia local que, por sua vez, agrava a falciformação, piora a hipóxia, e assim por diante.

A relação deste fenómeno com a oxigenação tem a ver com o facto de só existirem zonas complementares para a adesão entre moléculas de hemoglobina S na forma desoxigenada. Além do estado de oxigenação do sangue, existem outros factores que influenciam a falciformação e a respectiva gravidade: concentração de hemoglobina globular, desidratação dos glóbulos vermelhos, presença doutras variantes de hemoglobina no glóbulo (por exemplo, a hemoglobina F não participa na falciformação), pH e os níveis de 2,3-bisfosfoglicerato.

A doença de células falciformes é transmitida hereditariamente, podendo o indivíduo receber um gene (neste caso apenas 35-40% da sua hemoglobina tem a alteração característica da variante S), ou receber os dois genes (um de cada progenitor) e não ter assim qualquer produção da variante normal (hemoglobina A).

Esta doença vai apresentar múltiplas manifestações, que se podem dividir em 3 grandes grupos (Quadro III).

**Quadro III** – Tipos e manifestações clínicas da drepanocitose

Tipos	Caracterização
<b>Constitucionais</b>	Atraso de crescimento e do desenvolvimento físico; maior susceptibilidade às infecções;
<b>Vaso-oclusivas</b>	Microenfartes (que se manifestam por crises dolorosas); macroenfartes (conducentes a lesões de órgão);
<b>Anemia</b>	Hemólise intensa e crises aplásicas (deficiente produção de elementos sanguíneos por esgotamento da medula óssea, face ao aumento das necessidades após hemólise intensa, desencadeada por infecções ou por carência de factores necessários à produção de glóbulos vermelhos).

Os indivíduos com só um gene para a hemoglobina S têm menos manifestações clínicas, sendo este traço em geral detectado por análises de rotina (ou por terem crises de falciformação durante um *stress* muito intenso). No entanto, a função renal é sempre lesada por obliteração microvascular.

O diagnóstico da drepanocitose é feito por electroforese da hemoglobina. Utiliza-se também para rastreio um teste baseado na indução da falciformação (pela adição de metassulfito ao sangue, pois este composto induz desoxigenação sanguínea).

### CARBOXI-HEMOGLOBINA

*Mário Carreira*

O monóxido de carbono (CO) é um dos principais poluentes atmosféricos. É produzido na maior parte pela actividade humana, resultando 50-60% dos motores de explosão. Uma porção menor é produzida pelos vulcões, fogos florestais, animais e plantas. Certos grupos populacionais quer pelos seus hábitos (tabagismo) ou pela sua profissão (ex: operários químicos, metalúrgicos, bombeiros, e outros) estão cronicamente expostos a níveis elevados de CO.

As causas mais graves de exposição ao CO devem-se a poluição doméstica (esquentadores, braseiras, etc.) ou a acidentes (fogos). Contudo, a maior causa de exposição crónica é o consumo de tabaco em recintos fechados.

O CO atravessa a membrana alveolar e liga-se à hemoglobina no mesmo local de ligação do O<sub>2</sub> ao ferro do heme, mas com uma afinidade 200 vezes superior à do oxigénio, formando a carboxi-hemoglobina. O CO também se liga, embora com menor afinidade, à mioglobina e à citocromo-oxidase.

A saturação parcial da hemoglobina pelo CO diminui a capacidade de transporte de oxigénio, originando um desvio da curva de dissociação da oxi-hemoglobina para a esquerda, verificado experimentalmente. A consequência deste processo é a hipóxia e, a persistir eventualmente, a anóxia e a morte.

### TALASSÉMIAS

*Maria João Costa*

As talassémias são anomalias genéticas da síntese da hemoglobina caracterizadas por uma redução da produção de um tipo específico de globina.

As cadeias proteicas, embora produzidas em menor número que o habitual, são estruturalmente normais. Trata-se, portanto, de um defeito “quantitativo” de síntese.

Cada indivíduo possui quatro genes responsáveis pela cadeias  $\alpha$ , localizados no cromosoma 16 (tendo herdado 2 de cada progenitor), enquanto possui apenas 2 genes de cadeias  $\beta$  localizados no cromosoma 11, um de cada progenitor.

Estes distúrbios, de carácter heredo-familiar, devem-se à perda da informação genética correspondente a um ou mais destes genes.

A deficiência na síntese de cadeias  $\beta$  é designada por  $\beta$ -talassémia, enquanto a redução da síntese das cadeias  $\alpha$  é referida como  $\alpha$ -talassémia.

Esta condição conduz a um largo espectro de situações clínicas que vão desde a ausência de doença até à anemia fatal.

### Epidemiologia

As talassémias são encontradas mais frequentemente no Mediterrâneo, Médio Oriente, Índia e Sudoeste Asiático. No nosso país são mais comuns no sul (Alentejo e Algarve), onde inclusivamente é descrita uma forma específica designada por “ $\beta$ -talassémia Portuguesa”. Pensa-se que esta distribuição geográfica desigual se deve à protecção que as formas clinicamente moderadas conferem contra a malária. Assim, nas regiões onde esta é endémica, por selecção natural tornou-se extremamente comum a heterozigotia para as mutações talassémicas.

### Classificação Clínica

A anemia de Cooley corresponde à forma grave da  $\beta$ -talassémia. Manifesta-se entre o 6º e o 8º

mês de vida, altura em que, na criança normal a hemoglobina F, predominante durante a vida fetal, diminui, dando progressivamente lugar à forma do adulto, a hemoglobina A. Devido à inexistência de cadeias  $\beta$  ( $\beta^0 \beta^0$ ) ou ao seu número muito reduzido ( $\beta^+ \beta^+$ ) a hemoglobina A não se forma em quantidade normal. As cadeias  $\alpha$  em excesso precipitam no interior do glóbulo vermelho e originam a sua destruição, quer no interior da medula óssea (eritropoiese ineficaz) quer no sangue periférico aquando da sua passagem pelo baço (hemólise por sequestração esplénica). Como mecanismos de compensação assiste-se à hiperplasia da série eritrocítica medular e à eritropoiese extra-medular (fígado e baço). Surge uma anemia grave hipocrômica e microcítica (os glóbulos vermelhos são pequenos e com redução percentual da sua hemoglobina), expansão medular com deformações ósseas (torricefalia, fâcies de “esquiilo”), osteoporose com fracturas patológicas, aumento do volume do fígado e do baço (hepatoesplenomegalia), atraso do crescimento e do desenvolvimento.

A hidropsia fetal sobrevém à ausência dos 4 genes responsáveis pela síntese de cadeias  $\alpha$  ( $-\alpha-\alpha$ ). Estas estão ausentes, enquanto as cadeias  $\beta$  e  $\gamma$  em excesso polimerizam com aparecimento de hemoglobinas anormais: Hb H ( $\beta_4$ ) e Hb Barts ( $\gamma_4$ ). A Hb A não é sintetizada. Esta situação leva

à morte ao fim de algumas horas de vida, ou mesmo à morte “in utero”.

A doença da hemoglobina H surge quando a criança herda apenas um gene  $\alpha$  ( $-\alpha$ ), do que resulta a formação de Hb H ( $\beta_4$ ) que constitui mais de 30% do total de hemoglobina presente nos glóbulos vermelhos. A hemoglobina H é um tetrâmero instável no eritrócito maduro. Precipita sobretudo perante “stress” oxidativo (por exemplo, com fármacos oxidativos tais como sulfonamidas) formando inclusões citoplásmicas, as quais são responsáveis por hemólise. Na fase inicial da vida do eritrócito a Hb H mantém-se solúvel, não causando eritropoiese ineficaz.

As talassémias *minor* ocorrem em indivíduos heterozigóticos, devido a uma mutação que afecta a síntese da globina,  $\alpha$  ou  $\beta$ . Caracteristicamente, os glóbulos vermelhos são microcíticos e hipocrômicos. A contagem total dos glóbulos vermelhos está aumentada (10-20% superior ao normal) sendo a anemia, quando presente, ligeira. A distinção entre o traço  $\beta$ -talassémico e o traço  $\alpha$ -talassémico só é possível com testes laboratoriais (electroforese das hemoglobinas) que demonstram, no caso do traço  $\beta$ -talassémico, um discreto aumento da Hb A<sub>2</sub> ( $\alpha_2 \delta_2$ ) e da Hb F ( $\alpha_2 \gamma_2$ ).

Nos portadores assintomáticos, o defeito na síntese da globina  $\alpha$  ou  $\beta$  é tão pequeno que não há alteração evidente da síntese da hemoglobina.