

XI SEMINÁRIO

Tema: HEMOGLOBINAS NORMAIS E ANORMAIS – DREPANOCITOSE

Subtemas:

- Hemoglobinas normais e hemoglobinopatias
- Clínica da drepanocitose

Intervenientes

- Docente convidado
 - Dra. Filomena Pereira (Assistente Hospitalar de Pediatria/HSM)
- Docente do Instituto de Bioquímica/FML:
 - Dr. Luís Sargento (Monitor)

Metodologia

- Avaliação diagnóstica dos participantes
 - Apresentação de casos clínicos
 - Orientadores do seminário
 - Apresentação de uma ficha sobre sangue e formas eritrocitárias
 - Síntese temática
 - Avaliação final dos participantes
-

INTRODUÇÃO

Apresentação do Filme “*A Forma dos Glóbulos Vermelhos*” (SANDOZ)

Sumário:

- Observação de esfregaços de sangue total ao microscópio óptico, microscópio de contraste de fase e microscópio de interferência.
- O glóbulo vermelho em microscopia electrónica clássica e de varredura
- Exemplos de alteração da forma dos glóbulos vermelhos (Equinocitos, Esferoequinocitos, Estomatocitos, Acantocitos, Esferocitos, Poiquilocitos, Dacriocitos, Células em alvo).

HEMOGLOBINAS NORMAIS E HEMOGLOBINOPATIAS

Luís Sargento

Estrutura e Funções da Hemoglobina

Estrutura

A hemoglobina (Hb) é uma proteína constituída por quatro monómeros, unidos entre si por ligações não covalentes, numa estrutura quaternária. Cada monómero é constituído por uma fracção proteica (globina) e por um grupo prostético (heme).

Existem diversos tipos de globinas (α , β , γ , δ , ϵ), sendo a molécula de hemoglobina constituída obrigatoriamente por duas globinas alfa e por duas não alfa, o que condiciona a existência de diferentes tipos de hemoglobina, por exemplo Hb A₁ ($\alpha_2\beta_2$), Hb A₂ ($\alpha_2\delta_2$), Hb F ($\alpha_2\gamma_2$).

O grupo prostético da hemoglobina é o heme – um quelato de um tetrapirrol (protoporfirina IX) e de um átomo de ferro (Fe) central. O ferro está normalmente na forma ferrosa (Fe²⁺). Quando o ferro está na forma oxidada (Fe³⁺), o grupo passa a ter a designação de hemina.

O ferro do grupo heme está ligado aos quatro átomos de azoto de cada molécula de pirrol e à histidina proximal da cadeia polipeptídica respectiva. Na desoxi-hemoglobina a 6.^a ligação de coordenação está desocupada, caso o ferro esteja bivalente, enquanto que na oxi-hemoglobina se encontra ligado ao oxigénio e na metahemoglobina à água.

A função da globina na molécula de hemoglobina não é somente estrutural ou a de modular a afinidade do heme para o oxigénio, mas também a de tornar possível a reversibilidade da ligação entre o ferro e o oxigénio. O átomo de Fe²⁺, por si só, é incapaz de se ligar reversivelmente ao oxigénio, autooxidando-se. A globina tem uma conformação tal que o heme fica envolvido numa bolsa hidrofóbica, evitando assim a sua oxidação.

Oxi-hemoglobina /Desoxi-hemoglobina

Quando a hemoglobina (com o ferro bivalente) está ligada ao oxigénio tem a designação de oxi-hemoglobina, e a de desoxi-hemoglobina quando não está ligada ao oxigénio. A ligação estabelecida entre a molécula de hemoglobina e o oxigénio condiciona alterações da conformação proteica, à custa das ligações entre monómeros assimétricos; em consequência, as duas formas de hemoglobina apresentam estruturas cristalinas e espectros de absorção diferentes. Os comprimentos de onda de absorção máxima são 540nm e 660nm, respectivamente para a oxi-hemoglobina e desoxi-hemoglobina.

Funções da Hemoglobina

A principal função da hemoglobina é o transporte de oxigénio (dos pulmões para os tecidos) e de parte do dióxido de carbono (dos tecidos para os pulmões).

A quantidade de oxigénio ligado à hemoglobina em determinado instante está intimamente relacionada com a pressão do oxigénio no sangue (PO₂), verificando-se um aumento da saturação (S)

da hemoglobina em oxigénio (SO_2) à medida que o PO_2 aumenta. A representação gráfica da variação da percentagem de saturação da hemoglobina e a PO_2 tem a designação de curva de dissociação da oxi-hemoglobina. Esta curva tem um perfil sigmóide que traduz o efeito cooperativo existente entre as quatro subunidades de globina na presença das moléculas de oxigénio. Assim, quando uma subunidade capta oxigénio (no grupo heme) induz uma alteração da conformação tridimensional da molécula de hemoglobina, favorecendo a captação de outras moléculas de oxigénio pelas restantes subunidades. A interação da PO_2 com a SO_2 definida pelo valor da P_{50} , que corresponde à PO_2 para uma saturação da hemoglobina de 50%. A P_{50} expressa o valor da afinidade da hemoglobina para o oxigénio.

A curva de dissociação da oxi-hemoglobina pode ser influenciada por diversos factores: pH sanguíneo, PCO_2 , temperatura e a concentração do 2,3-bisfosfoglicerato (2,3-BPG). A diminuição dos valores da PCO_2 e do 2,3-BPG, o aumento dos valores de pH, a hipotermia e a presença de Hb fetal desviam a curva para a esquerda, induzindo assim o aumento da afinidade da Hb para o oxigénio. A variação no sentido oposto dos factores modulares favorece a dissociação do oxigénio para os tecidos (por diminuição da afinidade da hemoglobina para o oxigénio), melhorando assim a oxigenação tecidual.

Estes processos de regulação são de extrema importância para a homeostasia do transporte de oxigénio, permitindo ainda que a oxigenação continue a processar-se em condições desfavoráveis.

Síntese da hemoglobina durante o desenvolvimento fetal

A eritropoiese é o processo de síntese de eritrocitos. No homem adulto ocorre quase exclusivamente na medula óssea a partir duma célula estaminal pluripotente. No entanto, durante o desenvolvimento embrionário outros órgãos estão implicados neste processo. As primeiras células que

contêm hemoglobina são produzidas no saco vitelino, sendo activada mais tarde a eritropoiese hepática, esplénica e só posteriormente, a medular. Cada um desses órgãos tem preferência pela produção de um determinado tipo de globina.

O principal órgão implicado na eritropoiese fetal é o fígado, que produz principalmente Hb F, constituída por cadeias alfa e gama ($\alpha_2\gamma_2$). Progressivamente, ocorre o incremento da síntese de cadeias beta (na medula óssea) e a diminuição da síntese de cadeias gama; por consequência aumenta a percentagem de Hb A (forma típica do adulto). O Quadro I resume os tipos de hemoglobina sintetizados durante o desenvolvimento embrionário e fetal.

Quadro I – Apresentação da relação entre o tipo de hemoglobina e o estadio de desenvolvimento

Estadio de desenvolvimento	Tipo de Hb
Embrionário	Gower 1, Gower 2, Portland 1
Fetal	Hb Fetal

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.

Patologia da Hemoglobina

As doenças da hemoglobina podem ser divididas em dois grupos:

- i) Alterações quantitativas (talassémias) – São doenças em que há diminuição da síntese de hemoglobina, devido à menor produção de um determinado tipo de globina. Por exemplo, nas talassémias há menor produção de cadeias α do que β , verificando-se o oposto na talassémia β .
- ii) Alterações qualitativas (hemoglobinopatias) – São doenças em que, devido a mutações genéticas pontuais, há a produção de hemoglobinas anormais (p.ex., Hb S, Hb Colónia).

Hemoglobina S

A hemoglobina S é o exemplo paradigmático da causa de uma hemoglobinopatia. Nesta molécula de hemoglobina há a substituição do aminoácido glutamina pelo aminoácido valina, na posição 6 das duas cadeias β .

Este tipo de hemoglobina existe numa doença designada por drepanocitose, em que os eritrócitos perdem a sua normal biconcavidade e tomam a forma de foice, através de um processo denominado de falciformização.

Falciformização eritrocitária

Em 1927 Hahn e Gillespie evidenciaram que o processo de falciformização dependia da desoxigenação da hemoglobina.

Os tetrâmeros de Hb são estáveis em solução quando a concentração de Hb S, pH, forças iónicas e temperatura são mantidos entre determinados limites. Pequenas perturbações nestes factores resultam na precipitação abrupta do gel de Hb S.

Durante a fase de desoxigenação, acidémia ou em situações de aumento da temperatura dá-se a polimerização da Hb S em fibras (diâmetro cerca de 20nm), estabilizadas por ligações hidrofóbicas entre as β_6 -valina e outras zonas de contacto. Verifica-se também interacção molecular com outras formas de hemoglobina, realçando-se a Hb A que participa mais rapidamente no processo de co-polimerização com a Hb S do que a Hb F. Os agregados de Hb S interactuam com a membrana do eritrócito, por mecanismos desconhecidos.

Esta transição do estado conformacional da Hb S é determinante na distorção da morfologia dos eritrócitos com repercussão no transporte de oxigénio.

Messer e Bradley descreveram dois tipos de eritrócitos na drepanocitose, consoante a densidade expressa em concentração média de hemoglobina globular:

- i) Uma fracção de eritrócitos densos (CMHG = 36g/dL), que exhibe polimerização rever-

sível e reversibilidade do processo de falciformização.

- ii) Uma fracção de eritrócitos muito densos (CMHG = 44g/dL) que exhibe polimerização reversível, mas irreversibilidade na alteração da forma globular.

Membrana Eritrocitária

A célula viva é uma entidade dinâmica onde ocorrem alterações fisiológicas de natureza físico-química. Para que a célula possa realizar essas funções deverá estar envolvida por uma membrana que permite a separação entre os meios intracelular e extracelular.

A membrana serve não só como barreira de separação selectiva, mas também como estruturas-base, onde se encontram ligados sistemas enzimáticos e de transporte importantes para o normal funcionamento globular.

As evidências combinadas da microscopia electrónica, composição química (40% de lípidos e 60% de proteínas) e os resultados de estudos físicos de permeabilidade e de movimento das proteínas e lípidos suportam o modelo do mosaico-fluido para a estrutura das membranas biológicas. Fosfolípidos anfipáticos e esteróis formam a bicamada lipídica. Nesta camada lipídica estão embedidas proteínas globulares (extrínsecas, intrínsecas e/ou transmembranares).

Em resumo apresentam-se as propriedades gerais e alguns exemplos destes tipos de proteínas da membrana eritrocitária:

- i) proteínas extrínsecas – Proteínas de associação fraca à membrana e solúveis em água. As interacções com os lípidos são polares. Exemplo: espectrina e gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase.
- ii) proteínas intrínsecas – Proteínas fortemente ligadas à membrana, não solúveis em água e que apresentam ligações hidrofó-

bicas e polares com os lípidos. Exemplo: acetilcolinesterase e ATPase $\text{Na}^+\text{-K}^+$.

iii) proteínas transmembranares – Proteínas que atravessam a membrana de lado a lado. Exemplo: glicoforina.

CLÍNICA DA DREPANOCITOSE

Filomena Pereira

Prevalência, prevenção, diagnóstico precoce

Foi calculado em 1983 que cerca de 60 milhões de indivíduos eram portadores de traço drepanocítico (hemoglobina S), 50 dos quais habitavam em África; o número global em 1992 deveria ascender a 78 milhões.

Em cada ano nascem cerca de 156.000 crianças com anemia de células falciformes, das quais 130.000 em África.

Embora Portugal tenha recebido milhares de Africanos nos últimos 20 anos, a doença já residia cá, quer como herança da ocupação Árabe, quer da miscigenação ao longo de séculos.

Conhecendo a mutação e os factores de instabilidade que condicionam a alteração na estrutura da Hemoglobina, torna-se possível entender todos os aspectos clínicos:

a) Anemia

A alteração da forma dos glóbulos vermelhos conduz à sua remoção precoce da circulação, determinando um encurtamento da vida média do eritrócito com consequente anemia crónica.

A medula óssea tenta, com hiperprodução de glóbulos vermelhos, compensar essa carência.

Qualquer factor de instabilidade acrescido poderá provocar um agravamento da anemia.

b) Crises vaso-oclusivas

A falciformização e a aglomeração de eritrócitos na microcirculação levam à interrupção do

fluxo sanguíneo, com enfartes nas áreas afectadas, o que se vai traduzir por episódios agudos, geralmente dolorosos:

- a) Ossos: dor óssea aguda, por vezes com sinais inflamatórios locais. As áreas mais afectadas são a coluna lombo-sagrada, o joelho, o ombro, o cotovelo, o fémur, o esterno, as costelas e as clavículas. Nas crianças abaixo dos 5 anos de idade ocorre, frequentemente, nos pequenos ossos das mãos e dos pés.
- b) Pulmões: as crises vaso-oclusivas determinam um quadro de disfunção respiratória.
- c) Abdómen: dor abdominal aguda, geralmente é devida a falciformização nos vasos mesentéricos. Pode também corresponder a microenfartes em qualquer órgão abdominal.
- d) Sistema Nervoso Central: por oclusão das artérias cerebrais poderá ocorrer um quadro neurológico com mortalidade elevada e grande risco de sequelas.
- e) Priapismo: trata-se de uma erecção persistente do pénis, muitas vezes dolorosa, que, no caso da drepanocitose, se verifica geralmente em doentes com mais de 10 anos. Deve-se a falciformização nos corpos cavernosos do pénis e pode levar à impotência.

c) Crises aplásticas

Dado o esforço de hiperprodução medular compensatória, qualquer factor que o impeça, geralmente uma infecção, provocará agravamento da anemia.

d) Crises de sequestração esplénica

Condicionam a acumulação maciça de sangue num baço muito aumentado de volume e sendo um risco de vida sobretudo em crianças pequenas.

e) Susceptibilidade às infecções

São vários os factores que interagem, tornando o indivíduo drepanocítico num alvo fácil para infecções muitas vezes graves e mortais.

f) Lesões de órgãos por agressão constante**g) Alteração do crescimento e do desenvolvimento corporal****Casos Clínicos – análise, interpretação e discussão****Caso Clínico 1**

- Menino de raça negra, com 4 meses de idade;
- Terceiro filho de pais jovens, naturais de São Tomé e Príncipe;
- O primeiro filho do casal faleceu aos 5 meses;
- Aparentemente saudável até 15 dias antes do internamento, altura em que teve febre e tosse; desde aí ficou prostrado e progressivamente mais pálido.

Foram realizados diversos exames complementares de diagnóstico, nomeadamente um hemograma com os seguintes resultados:

Hemoglobina – 4,6g/dL
 N.º Glóbulos vermelhos – 1.400.000/mL
 N.º Glóbulos brancos – 8.000/mL
 N.º Plaquetas – 156.000/mL

- Interpretação do hemograma
- Introdução do conceito de anemia

Para esclarecimento da situação foi efectuado um esfregaço de sangue periférico

- Técnica de realização de um esfregaço
- Observação de um esfregaço normal

Questões:

- a) O que se espera encontrar no esfregaço realizado?

- b) Tendo em conta as funções da hemoglobina no organismo, quais as consequências da sua diminuição?
- c) Existe alguma relação possível entre o resultado do hemograma e o quadro clínico apresentado, ou serão independentes?

Caso Clínico 2

- Menino de raça negra, com 18 meses, residente em Luanda;
- Desde os 12 meses que teve vários episódios de dores abdominais intensas e outros de grande prostração, que levaram a 4 internamentos em que fez transfusões de sangue;
- Veio ao Serviço de Urgência por apresentar dor e grande edema nas duas mãos;
- A hemoglobina era de 7,4g/dL.

Caso Clínico 3

- Menino de raça negra, de 4 anos de idade, nascido em Luanda e residente em Lisboa;
- Teve, desde os 20 meses, 3 internamentos por pneumonia. Não tem necessitado de transfusões de sangue;
- Veio ao Serviço de Urgência por apresentar febre, grande palidez e prostração;
- Hemoglobina – 5,6g/dL.

Caso Clínico 4

- Menina de 13 anos de idade, de raça caucasiana, natural e residente em Beja;
- Desde os 20 meses de idade, altura em que é feito o diagnóstico, tem internamentos frequentes por dores abdominais e sacrococígeas. Necessita anualmente de uma transfusão de eritrócitos;
- Apresenta um aspecto de criança mais nova (cerca de 8 anos) e recorreu ao Serviço de Urgência por dores abdominais;
- Hemoglobina – 8,2g/dL.

Conclusões

Se a terapêutica etiológica não é, de momento, acessível, o conhecimento da doença e de uma série de medidas profiláticas e de suporte permitem melhorar substancialmente a qualidade de

vida e a sobrevivência dos indivíduos com anemia de células falciformes.

Também o conhecimento da população em risco poderá, através do aconselhamento genético, diminuir a incidência da doença.