

SUSAN ELISABETH JORGE

ESTUDO FUNCIONAL DE VARIANTES
ESTRUTURAIS DA HEMOGLOBINA
HUMANA

CAMPINAS
2009

SUSAN ELISABETH DOMINGUES COSTA JORGE

ESTUDO FUNCIONAL DE VARIANTES ESTRUTURAIS DA HEMOGLOBINA HUMANA

*Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-graduação em Ciências
Médicas da Faculdade de Ciências Médicas
da Universidade Estadual de Campinas para
obtenção do título de Mestre em Ciências
Médicas, na área de concentração em
Ciências Biomédicas.*

ORIENTADORA: PROFA. DRA. MARIA DE FÁTIMA SONATI
(Departamento de Patologia Clínica – Faculdade de Ciências Médicas – UNICAMP)

CO-ORIENTADOR: PROF. DR. MUNIR SALOMÃO SKAF
(Departamento de Físico-Química – Instituto de Química – UNICAMP)

CAMPINAS
2009

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

J768e Jorge, Susan Elisabeth Domingues Costa
Estudo funcional de variantes estruturais da hemoglobina humana
/ Susan Elisabeth Domingues Costa Jorge. Campinas, SP : [s.n.],
2009.

Orientadores : Maria de Fátima Sonati, Munir Salomão Skaf
Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Policitemia. 2. Cianose. 3. Hemoglobina. 4. População.
5. Variação genética. 6. Genética molecular. I. Sonati, Maria de
Fátima. II. Skaf, Munir Salomão. III. Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Título em inglês : Functional studies of structural variants of human hemoglobin

Keywords: • Policitemia
• Cyanosis
• Hemoglobin
• Population
• Variation genetic
• Molecular genetic

Titulação: Mestre em Ciências Médicas

Área de concentração: Ciências Biomédicas

Banca examinadora:

Profª. Drª. Maria de Fátima Sonati

Prof. Dr. Flávio Augusto Vicente Seixas

Profª. Drª. Eneida de Paula

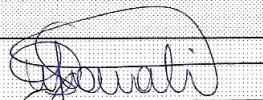
Data da defesa: 28-08-2009

Banca examinadora da Dissertação de Mestrado
Susan Elisabeth Domingues Costa Jorge

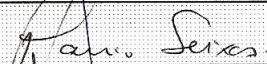
Orientadora: Profa. Dra. Maria de Fátima Sonati

Membros:

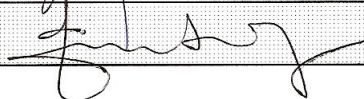
1. Profa. Dra. Maria de Fátima Sonati -



2. Prof. Dr. Flávio Augusto Vicente Seixas -



3. Profa. Dra. Eneida de Paula -



Curso de pós-graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas.

Data: 28/08/2009

DEDICATÓRIA

*Àqueles que depositaram suas esperanças
nos frutos provenientes deste trabalho...
A estas pessoas, as quais, a mim, não são somente
nomes, é que dedico não somente esta tese
como os meus mais nobres sentimentos...*

AGRADECIMENTOS

Não poderia deixar de agradecer
À Vida, que de modo inusitado ofereceu
Esta grande oportunidade de aprender
E crescer pessoalmente...

Ao meu pai e *madrecita*
Que através de seus exemplos de luta
Ensinaram-me o valor da labuta,
Desde outras terras, em tempos idos.

À Profa. Fátima, minha orientadora,
Atenciosa e cara tutora
Que me felicitou esta oportunidade,
Vendo em mim certas capacidades;

À Satie e ao Prof. Munir,
Aos quais serei sempre grata,
Pela amizade firmada,
E pela solicitude em instruir.

Ao meu querido Anders
Que por vias inesperadas conheci
E se tornou aquele com quem dividi
Todos meus sentimentos.

Aos meus amigos queridos,
Ombros sinceros e benditos,
Que nos instantes mais precisos
Foram, de minh' alma, o arrimo:

Elzinha e Denise,
Corações de ouro;
Cíntia, Polly, Taninha, Magnum e Vânia,
Amizade qual tesouro.

A todo o pessoal da Hematologia
Que sempre esteve me auxiliar
Através da alegria,
Dando-me forças íntimas para continuar.

Aos que, pelo laboratório, passaram,
Bem como aos que nele, agora, se achegaram:
Felipe, Crica, Amanda, Dani, Gabriel, Vanessa e outros nomes,
Os quais, a mim, deixaram um pedaço de si.

Não menos importantes
Aqueles que me foram duros,
Por se tornarem professores puros
Completando meu eterno aprendizado...

*“Há no céu e na terra, bem mais coisas
Do que sonhou jamais nossa filosofia.”
Shakespeare*

A hemoglobina (Hb), pigmento respiratório de todos os organismos vertebrados, encontra-se em elevadas concentrações nas hemácias e é responsável pelo transporte de O₂ dos pulmões para os tecidos. A Hemoglobina humana constitui-se de dois pares de cadeias polipeptídicas (globinas), cada qual envolvendo um grupo prostético heme, que se liga reversivelmente ao O₂. Mais de 1000 variantes estruturais da Hb humana já foram descritas, parte delas relacionada a manifestações clínicas importantes. Algumas variantes apresentam alteração funcional, que se traduz em afinidade modificada pelo O₂. Quando elevada, há uma produção compensatoriamente maior de hemácias, levando à policitemia; quando diminuída, resulta em cianose. O Laboratório de Hemoglobinopatias do Departamento de Patologia Clínica da FCM/UNICAMP é um dos laboratórios de referência no país, tendo identificado, até o momento, 12 hemoglobinas novas e 51 variantes raras. Destas, as variantes novas Hb Hb Boa Esperança ($\alpha 16$ Lys→Thr), Hb Itapira ($\alpha 30$ Glu→Val), Hb Bom Jesus da Lapa ($\alpha 30$ Glu→Ala), Hb Olinda [$\beta 22$ (b4) –25 (b7)], Hb Caruaru ($\beta 122$ Phe→Ser) e Hb S-São Paulo ($\beta 6$ Glu→Val ; $\beta 65$ Lys→Glu) foram aqui caracterizadas funcionalmente, assim como as variantes raras Hb Iwata ($\alpha 87$ His→ Arg), Hb Sunshine Seth ($\alpha 94$ Asp→His), Hb Deer Lodge ($\beta 2$ His→ Arg), Hb Deer Lodge ($\beta 2$ His→ Arg) + Hb S ($\beta 6$ Glu→ Val), Hb G-Siriraj ($\beta 7$ Glu→ Lys), Hb G-Siriraj ($\beta 7$ Glu→ Lys) e Hb C ($\beta 6$ Glu→ Lys) em associação, Hb M-Saskatoon ($\beta 63$ His→ Tyr), Hb Redondo ($\beta 92$ His→ Asn), Hb Köln ($\beta 98$ Val→ Met), Hb Coimbra ($\beta 99$ Asp→ Glu) e Hb Dhonburi ($\beta 126$ Val→Gli)+ B^{tal}. O método analítico empregado foi descrito por Rossi-Fanelli & Antonini (1958), e analisa espectrofotometricamente o comportamento da Hb frente a conhecidas

pressões parciais de oxigênio (pO_2), possibilitando a medida de afinidade ($p50$), da constante de Hill (n), que verifica o fenômeno de cooperatividade entre as cadeias globínicas para ligação do O_2 , o efeito Bohr (que indica facilidade na ligação Hb- O_2 conforme é elevado o pH do meio), bem como a interação com o Inositol Hexafosfato (IHP), um fosfato poliânion que dificulta a ligação entre a Hb e o O_2 . À exceção das Hbs Itapira e Bom Jesus da Lapa, em concentrações reduzidas nos hemolisados, todas as demais apresentam afinidade alterada pelo oxigênio. Como complementação ao estudo funcional, as Hbs Caruaru e S-São Paulo também foram submetidas à análise por dinâmica molecular, através dos programas VMD (*Visual Molecular Dynamics*), com dados inseridos nos softwares CHARMM (*Chemistry at Harvard Molecular Mechanics*) e NAMD (*Nanoscale Molecular Dynamics*). As demais variantes tiveram sua análise estrutural individualizada feita através da visualização de estruturas nativas depositadas no *Protein Data Bank*, para melhor compreensão da relação entre o aminoácido substituído e a função protéica alterada. Deste modo, foi possível estabelecer correlações entre a estrutura e a função e inferir sobre as manifestações clínicas resultantes da presença destas *heme* proteínas anômalas, ilustrando-se assim a importância desses estudos para a completa caracterização das variantes.

The human hemoglobin (Hb) is the respiratory pigment of human organisms, found in high concentrations in the erythrocytes and is responsible for transporting O₂ from the lungs to the peripheral tissues. This molecule is composed by two pairs of polypeptide chains (globin), each one involving a prosthetic group *heme*, which bind reversibly to the O₂. More than 1000 structural variants had been described already; part of them related to important clinical manifestations. Some variants present functional alteration, with modified affinity for the O₂. When it is increased, it has a higher compensatory production of the erythrocytes, causing polycitemia; when decreased, it results on cyanosis. The Laboratory of Hemoglobinopathies of the Department of Clinical Pathology of the FCM/UNICAMP is one of the references laboratories in the country, and identified, until this moment, 12 new hemoglobins and 51 rare variants. The new variants Hb Boa Esperança ($\alpha 16$ Lys→Thr), Hb Itapira ($\alpha 30$ Glu→Val), Hb Bom Jesus da Lapa ($\alpha 30$ Glu→Ala), Hb Olinda [$\beta 22$ (b4) –25 (b7)], Hb Caruaru ($\beta 122$ Fen→Ser) and Hb S-São Paulo ($\beta 6$ Glu→Val ; $\beta 65$ Lys→Glu) were, in the present study, functionally characterized, as well as the rare variants Hb Iwata ($\alpha 94$ Asp→His), Hb Sunshine Seth ($\alpha 187$ His→ Arg), Hb Deer Lodge ($\beta 2$ His→ Arg), Hb Deer Lodge + Hb S ($\beta 2$ His→ Arg + $\beta 6$ Glu→ Val), Hb G-Siriraj ($\beta 7$ Glu→ Lis), Hb G-Siriraj +Hb C ($\beta 7$ Glu→ Lis + $\beta 6$ Glu→ Lis), Hb M-Saskatoon ($\beta 63$ His →Tir), Hb Redondo ($\beta 92$ His→ Asn), Hb Köln ($\beta 98$ Val→ Met), Hb Coimbra ($\beta 99$ Asp→ Glu) and Hb Dhonburi ($\beta 126$ Val→Gli) + B^{thal}. The analytical method used was described for Rossi-Fanelli & Antonini (1958), which analyses, by spectrophotometer, the behavior of the Hb against known partial pressures of

oxygen (pO_2), making possible the measure of affinity ($p50$), the constant of Hill (n), that verifies the cooperativity, the Bohr effect (that it indicates the relation between Hb- O_2 binding according to the pH), as well as the interaction with Inositol Hexaphosphoric acid (IHP), that difficult linkage between the Hb and the O_2 . Except from Hb Itapira and Hb Bom Jesus of the Lapa, in reduced concentrations at the total hemolysate, all the others presented modified affinity to the oxygen. As a complement of the functional study, the Hb Caruaru and Hb S-São Paulo were also submitted to previous molecular dynamics simulation. All the other variants were structurally analyzed by the study of the native structure deposited at the Protein Data Bank, to understand better the relation between the substituted residue and the modified one at the protein function. Therefore, it was possible to establish correlations between the structure and the function and to infer on the clinical manifestations because of the presence of these anomalous proteins, illustrating the importance of these studies for the complete characterization of the variants.

1. INTRODUÇÃO	33
1.1. Hemoglobina: Evolução	35
1.2. Estrutura da Hemoglobina	39
1.3. Propriedade de Ligação com Oxigênio	42
1.3.1. Modelos de ligação alostérica.....	48
1.3.2. Moduladores	50
a) Efeito Bohr	50
b) Fosfatos Orgânicos	51
c) Íons Cloreto e outros ânions monovalentes.....	53
d) Efeito da Temperatura	53
e) Efeito do CO ₂	55
1.4. Hemoglobinopatias	56
2. JUSTIFICATIVA	59
3. OBJETIVO	63
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	67
4.1. Variantes da hemoglobina humana	69
4.2. Purificação das hemoglobinas	72
4.3. Experimentos de dissociação de oxigênio	73
4.4. Cálculos e obtenção dos gráficos de Hill.....	77
4.5. Dinâmica Molecular	80
5. RESULTADOS.....	83
5.1. Variantes Novas	85
5.1.1. Variantes de Globina Alfa	85
a) Hb Boa Esperança	85
b) Hb Itapira e Hb Bom Jesus da Lapa.....	87

5.1.2. Variantes de Globina Beta.....	90
c) Hb Olinda	90
d) Hb Caruaru	92
e) Hb S-São Paulo	94
5.2 Variantes Raras.....	96
5.2.1. Variantes de Globina Alfa	96
f) Hb Iwata	96
g) Hb Sunshine Seth	98
5.2.2. Variantes de Globina Beta.....	100
h) Hb Deer Lodge.....	100
i) Hb Deer Lodge + Hb S	102
j) Hb G-Siriraj.....	103
k) Hb G-Siriraj + Hb C	105
l) Hb M-Saskatoon	107
m) Hb Redondo	109
n) Hb Köln.....	110
o) Hb Coimbra	112
p) Hb Dhonburi.....	113
5.3. Resumo dos Resultados dos Estudos Funcionais	115
5.4. Dinâmica Molecular	117
a) Hb Caruaru	117
b) Hb S-São Paulo	119

6 . DISCUSSÃO	121
6.1. Variantes Novas	123
6.1.1. Variantes de Globina Alfa	123
a) Hb Boa Esperança	123
b) Hb Itapira e Hb Bom Jesus da Lapa.....	125
6.1.2. Variantes de Globina Beta.....	127
c) Hb Olinda	127
d) Hb Caruaru	129
e) Hb S-São Paulo	131
6.2 Variantes Raras.....	136
6.2.1. Variantes de Globina Alfa	136
f) Hb Iwata.....	136
g) Hb Sunshine Seth	138
6.2.2. Variantes de Globina Beta.....	140
h) Hb Deer Lodge.....	140
i) Hb Deer Lodge + Hb S	142
j) Hb G-Siriraj.....	144
k) Hb G-Siriraj + Hb C	146
l) Hb M-Saskatoon	148
m) Hb Redondo	149
n) Hb Köln.....	151
o) Hb Coimbra.....	153
p) Hb Dhonburi.....	154

7 . CONCLUSÃO.....	157
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	163
9. ANEXOS	179
9.1. Anexo 1: Artigo publicado na revista <i>Hemoglobin</i>	181
9.2. Anexo 2: Artigo publicado na revista <i>European Journal of Haematology</i>	188
9.3. Anexo 3: Artigo publicado na revista <i>Genetics and Molecular Biology</i>	192
9.4. Anexo 4: Artigo publicado - <i>Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia</i>	195
9.5. Anexo 5: Capítulo aceito para livro <i>Medicina Genômica</i>	299
9.6. Anexo 6: Artigo publicado - <i>Revista de Investigación Clínica</i>	214

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Evolução dos genes de globina	36
Figura 2. <i>Clusters</i> responsáveis pela síntese das globinas humanas	37
Figura 3. Ontogenia das cadeias globínicas	38
Figura 4. Estrutura tridimensional da hemoglobina humana	39
Figura 5. A) Grupamento <i>heme</i> . B) Resíduos que interagem com <i>heme</i> na oxi-Hb	41
Figura 6. “ <i>Heme pocket</i> ”	43
Figura 7. Representação da hemoglobina em suas formas R e T	44
Figura 8. Forma sigmoidal de ligação da hemoglobina com o oxigênio	45
Figura 9. Gráfico de Hill	46
Figura 10. Modelo MWC para a ligação Hb-O ₂	49
Figura 11. Modelo seqüencial simples (KNF), para a ligação Hb-O ₂	50
Figura 12. Efeito Bohr alcalino	51
Figura 13. Cadeias β com 2,3 DPG entre elas.....	52
Figura 14. Tonômetro de boro silicato	74
Figura 15. Banho agitador de Tonômetros	75
Figura 16. Absorção óptica da oxi-Hb; desoxi-Hb e estados intermediários	76
Figura 17. Programa para cálculo de pO ₂	79
Figura 18. Efeito Bohr - Hb Boa Esperança.....	85
Figura 19. Cooperatividade em função do pH – Hb Boa Esperança.....	85
Figura 20. Efeito Bohr – Hb Itapira.....	87
Figura 21. Cooperatividade em função do pH – Hb Itapira	87
Figura 22. Efeito Bohr – Hb Bom Jesus da Lapa	87

Figura 23. Cooperatividade em função do pH - Hb Bom Jesus da Lapa	87
Figura 24. Efeito Bohr – Hb Olinda	90
Figura 25. Cooperatividade em função do pH – Hb Olinda.....	90
Figura 26. Efeito Bohr – Hb Caruaru	92
Figura 27. Cooperatividade em função do pH – Hb Caruaru.....	92
Figura 28. Efeito Bohr – Hb S-São Paulo	94
Figura 29. Cooperatividade em função do pH – Hb S-São Paulo	94
Figura 30. Efeito Bohr – Hb Iwata	96
Figura 31. Cooperatividade em função do pH – Hb Iwata.....	96
Figura 32. Efeito Bohr – Hb Sunshine Seth	98
Figura 33. Cooperatividade em função do pH – Hb Sunshine Seth.....	98
Figura 34. Efeito Bohr – Hb Deer Lodge	100
Figura 35. Cooperatividade em função do pH- Hb Deer Lodge	100
Figura 36. Efeito Bohr – Hb Deer Lodge + Hb S.....	102
Figura 37. Cooperatividade em função do pH – Hb Deer Lodge + Hb S	102
Figura 38. Efeito Bohr – Hb G-Siriraj.....	103
Figura 39. Cooperatividade em função do pH – Hb G-Siriraj	103
Figura 40. Efeito Bohr – Hb G-Siriraj + Hb C	105
Figura 41. Cooperatividade em função do pH – Hb G-Siriraj + Hb C.....	105
Figura 42. Efeito Bohr – Hb M-Saskatoon.....	107
Figura 43. Cooperatividade em função do pH – Hb M-Saskatoon	107
Figura 44. Efeito Bohr – Hb Redondo	109
Figura 45. Cooperatividade em função do pH – Hb Redondo	109
Figura 46. Efeito Bohr – Hb Köln.....	110
Figura 47. Cooperatividade em função do pH – Hb Köln.....	110

Figura 48. Efeito Bohr – Hb Coimbra	112
Figura 49. Cooperatividade em função do pH – Hb Coimbra.....	112
Figura 50. Efeito Bohr – Hb Dhonburi.....	113
Figura 51. Cooperatividade em função do pH – Hb Dhonburi	113
Figura 52. Resultados iniciais de Dinâmica Molecular da Hb Caruaru	118
Figura 53. Resultado das substituições para Hb S-São Paulo	119
Figura 54. Resíduo 16 da cadeia alfa	123
Figura 55. Resíduo 30 da cadeia alfa	125
Figura 56. Resíduos 22 ao 25 (em evidência) da cadeia beta (perdidos)	127
Figura 57. Resíduo 122 da cadeia beta - Estrutura nativa (2DN2 e 2DN1)	129
Figura 58. Processo de Polimerização da Hb S à Vasclusão.....	132
Figura 59. Resultados de Dinâmica Molecular da Hb S-São Paulo	133
Figura 60. Resíduo 87 da cadeia alfa	136
Figura 61. Resíduo 94 da cadeia alfa	138
Figura 62. Resíduo 2 (histidina) da cadeia beta, em interação com 2,3DPG	140
Figura 63. Resíduo 2 ($\beta 1$) e resíduo 6 ($\beta 2$), em interação com 2,3DPG.....	142
Figura 64. Resíduo 7 da cadeia beta.....	144
Figura 65. Resíduos 7 e 6 da cadeia beta.....	146
Figura 66. Resíduos 7 e 6 da cadeia beta.....	148
Figura 67. Resíduos 92 da cadeia beta	149
Figura 68. Resíduos 92 da cadeia beta	151
Figura 69. Resíduos 99 da cadeia beta	153
Figura 70. Resíduos 126 da cadeia beta	154

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Dados analíticos e clínicos das variantes de hemoglobina estudadas.....	70
Tabela 2. Resultados quantitativos para a Hb Boa Esperança.....	86
Tabela 3. Resultados quantitativos para as Hb Itapira e Hb Bom Jesus da Lapa	88
Tabela 4. Resultados quantitativos para a Hb Olinda.....	90
Tabela 5. Resultados quantitativos para a Hb Caruaru.....	92
Tabela 6. Resultados quantitativos para a Hb S-São Paulo	94
Tabela 7. Resultados quantitativos para a Hb Iwata.....	96
Tabela 8. Resultados quantitativos para a Hb Sunshine Seth.....	98
Tabela 9. Resultados quantitativos para a Hb Deer Lodge.....	100
Tabela 10. Resultados quantitativos para a Hb Deer Lodge + Hb S	102
Tabela 11. Resultados quantitativos para a Hb G-Siriraj	103
Tabela 12. Resultados quantitativos para a Hb G-Siriraj + Hb C.....	105
Tabela 13. Resultados quantitativos para a Hb M-Saskatoon	107
Tabela 14. Resultados quantitativos para a Hb Redondo	109
Tabela 15. Resultados quantitativos para a Hb Köln.....	111
Tabela 16. Resultados quantitativos para a Hb Coimbra.....	112
Tabela 17. Resultados quantitativos para a Hb Dhonburi	114
Tabela 18. Resultados dos Testes Funcionais das Variantes Estudadas.....	115

INTRODUÇÃO

1.1. Hemoglobina: Evolução

A hemoglobina (Hb) é uma heme proteína, presente nos eritrócitos de vertebrados, constituída por um grupo prostético *heme* inserido em cada uma das quatro cadeias globínicas que a compõem (ANTONINI e BRUNONI, 1971; SHIKAMA, 2006).

Recebeu a denominação de “hematoglobulina” ou “hemoglobina” pelo fisiologista e químico alemão Felix Hoppe-Seyler (1825-1895), e ficou conhecida também como “enzima honorária” devido à sua contribuição como modelo alostérico de enzimas (PERUTZ, 1995).

Esta proteína, pigmento respiratório de vertebrados, e de alguns invertebrados, tem seu histórico evolutivo iniciado a partir de pequenas hemoproteínas de seres unicelulares, que se utilizavam desta hemoproteína como transportadora de monóxido de carbono e óxido nítrico em seu metabolismo celular. Com o aparecimento de um ambiente oxigenado, há aproximadamente 2 bilhões de anos atrás, promoveu-se situação dramática a criaturas viventes na Terra, uma vez que o oxigênio era substância tóxica. O metabolismo destes organismos, por sua vez, passou a ser aeróbio e a hemoglobina se adaptou ao transporte de oxigênio. Logo, a interação, que inicialmente se dava entre o grupamento protoporfirínico contendo um metal em sua porção central e o óxido nítrico ou mesmo o gás carbônico, passou a também ser compartilhada com o oxigênio, em organismos mais complexos (HARDISON, 1999; SHIKAMA, 2006; WAJCMAN et al., 2009).

A duplicação do gene que codificava uma globina ancestral teria distinguido a hemoglobina da mioglobina, há aproximadamente 800 milhões de anos. As cadeias alfa e beta da hemoglobina somente passaram a ser sintetizadas por agrupamentos gênicos (*clusters*) distintos entre 450-500 milhões de anos. As demais diferenciações entre as

cadeias globínicas em ambos os *clusters*, a exemplo da expressão de genes específicos responsáveis pelas hemoglobinas embrionárias e fetais, estima-se ter ocorrido a partir de 300 milhões de anos atrás, encerrando-se possivelmente entre 40 e 50 milhões de anos atrás, com a duplicação dos genes alfa e gama, conforme pode ser visualizado na Figura 1 (HARDISON, 1999; SHIKAMA, 2006; BONILLA-RODRIGUEZ, 2007; WAJCMAN et al., 2009).

Apesar da diferença entre os organismos e distintos subtipos de hemoglobina, sua estrutura protéica é altamente conservada. Por isso esta molécula também é considerada um marcador evolutivo.

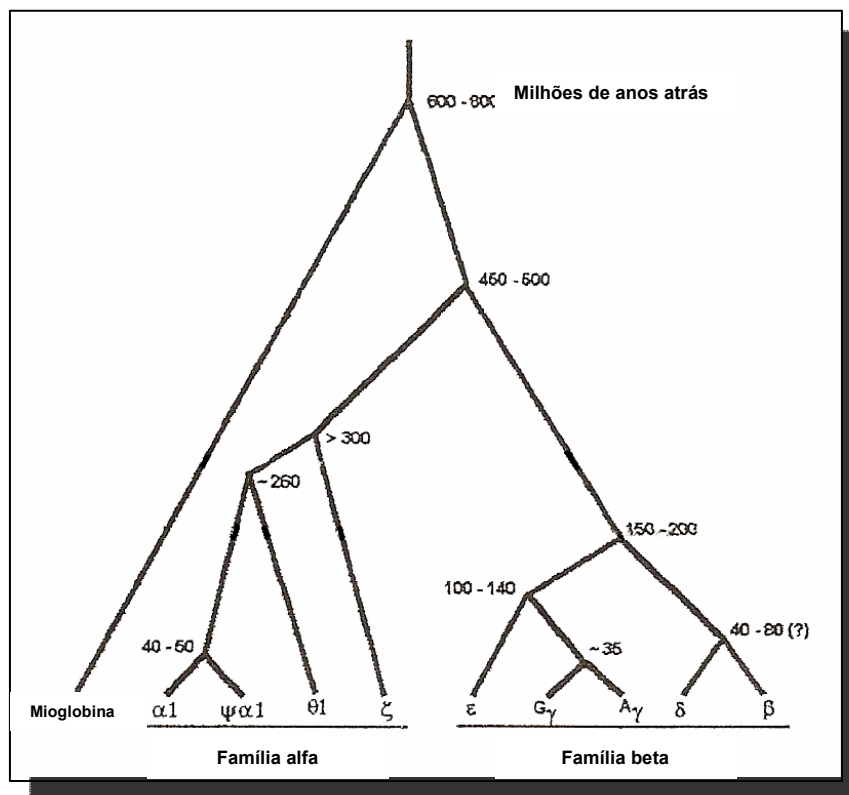


Figura 1. Evolução dos genes de globina (adaptado de BONILLA-RODRIGUEZ, 2007).

As hemoglobinas (Hb) humanas são tetrâmeros formados pela combinação de 2 cadeias polipeptídicas do “tipo α” (α ou ζ) com 2 cadeias do “tipo β” (β, δ, Gγ, Aγ ou ε).

Como as demais hemoglobinas de vertebrados, cada cadeia contém um grupo prostético heme, que se liga reversivelmente à molécula de oxigênio, cumprindo assim a função primária da hemoglobina, que é o transporte de oxigênio (BUNN e FORGET, 1986).

A síntese das cadeias globínicas está sob o controle de genes distintos, separados em 2 agrupamentos (*clusters*); os genes que codificam as cadeias α e ζ (*cluster α*) estão localizados no cromossomo 16 (16p 13.3), enquanto aqueles que codificam as cadeias β , δ , γ e ϵ (*cluster β*) estão no cromossomo 11 (11p 15.5) (BUNN e FORGET, 1986; HOFFBRAND et al., 2000; STEINBERG et al., 2001; WEATHERALL e CLEGG, 2001; WILLIAMS et al., 2001), conforme a Figura 2. Tanto os genes das cadeias α quanto os das cadeias γ são duplicados (α_1 e α_2 , e $G\gamma$ e $A\gamma$): os produtos protéicos dos genes α_1 e α_2 são idênticos, enquanto as cadeias produzidas pelos genes $G\gamma$ e $A\gamma$ diferem no resíduo 136 (glicina e alanina, respectivamente) (BUNN e FORGET, 1986; HOFFBRAND et al., 2000; STEINBERG et al., 2001; WEATHERALL e CLEGG, 2001; WILLIAMS et al., 2001).

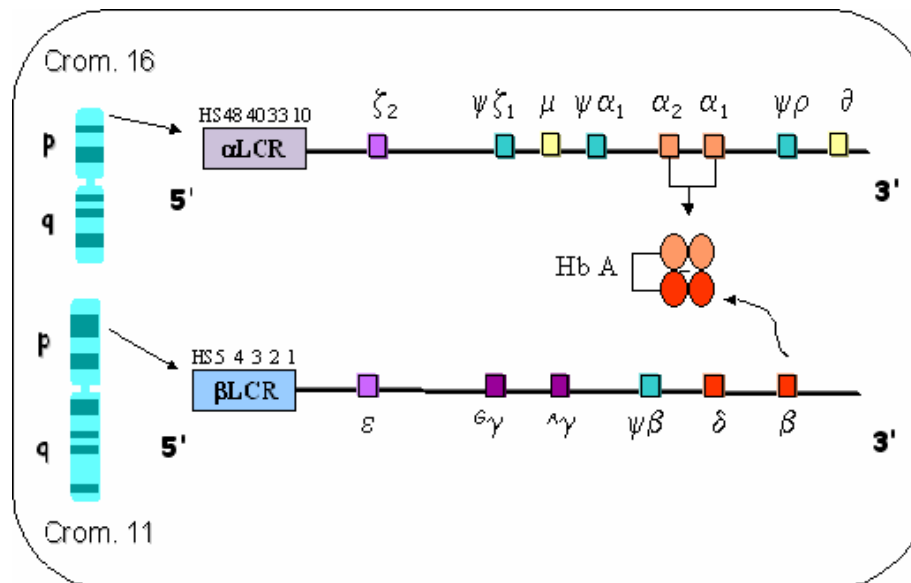


Figura 2. *Clusters* responsáveis pela síntese das globinas humanas (adaptado de BUNN e FORGET, 1986).

Para que o tetrâmero funcional possa ser formado, é preciso que a expressão desses genes se dê de forma balanceada, equilibrada. Assim, no estágio embrionário, são produzidas as hemoglobinas Gower I ($\zeta_2\varepsilon_2$), Gower II ($\alpha_2\varepsilon_2$) e Portland I ($\zeta_2\gamma_2$); no período fetal, estas são substituídas pela hemoglobina Fetal ($\alpha_2\gamma_2$), que, por sua vez, dá lugar às hemoglobinas A ou A₁ ($\alpha_2\beta_2$) e A₂ ($\alpha_2\delta_2$) no adulto. Em adultos normais, a hemoglobina A é predominante, compondo mais de 95% do total da hemoglobina celular, enquanto a A₂ se mantém em níveis entre 2-3% e a Fetal entre 0-2% (Figura 3) (BUNN e FORGET, 1986; HOFFBRAND et al., 2000; STEINBERG et al., 2001; WEATHERALL e CLEGG, 2001; WILLIAMS et al., 2001).

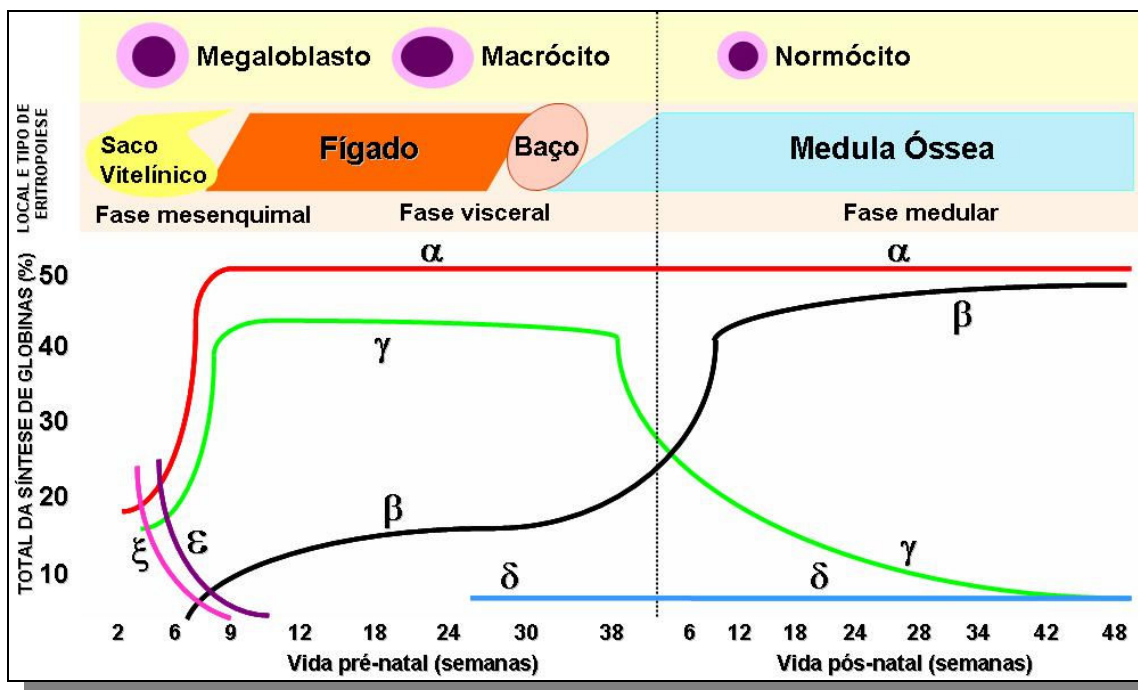


Figura 3. Ontogenia das cadeias globínicas (adaptado de BUNN e FORGET, 1986).

1.2. Estrutura da Hemoglobina

A estrutura da hemoglobina, altamente conservada, é composta por quatro cadeias globínicas, sendo duas do tipo alfa e duas do tipo beta, as quais apresentam um grupamento prostético *heme* (Figura 4), possuindo tamanho final de 6,4 x 5,5 x 5,0 nm e massa molecular de 64,45 kDa (PERUTZ, 1962; PERUTZ, 1964; STRYER, 1996). Estruturalmente estas cadeias são formadas por alfa-hélices (ordenadas de A até H), intermediadas por dobras entre elas, porções inter-hélices denominadas de acordo com sua posição espacial (AB, BC, etc.), além de suas porções terminais NA e HC. Deste modo, os resíduos são numerados de acordo com as coordenadas apresentadas a estrutura, a partir da porção N-terminal (PERUTZ et al., 1964; BUNN e FORGET, 1986; STRYER, 1996).

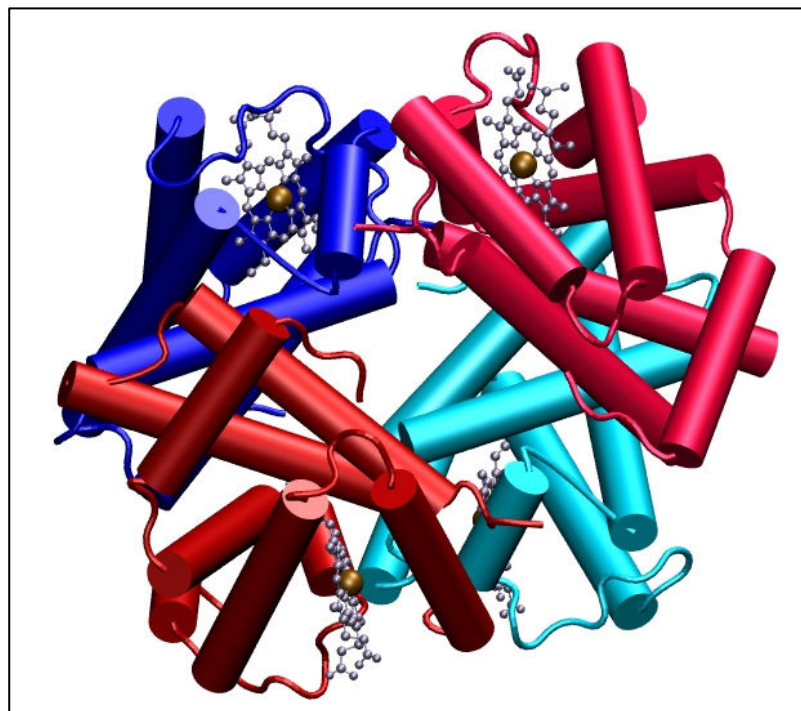


Figura 4. Estrutura tridimensional da hemoglobina humana visualizada no *Visual Molecular Dynamics* – adaptação da estrutura cristalográfica 2DN1, depositada no *Protein Data Bank*.

O grupo prostético *heme* é uma protoporfirina IX que acopla em sua porção central um átomo de ferro na sua forma ferrosa (Fe^{2+}), que por sua vez liga-se reversivelmente ao oxigênio promovendo à hemoglobina a sua função de transportadora deste gás para os tecidos periféricos. O grupamento *heme* é também capaz de se ligar ao monóxido de carbono (CO) e ao óxido nítrico (NO), com maior afinidade do que ao O_2 . No primeiro caso, parece não haver importância fisiológica primordial; ao contrário, este fato explica a elevada toxicidade que o CO representa ao organismo humano. Já no caso do NO (que também é inibidor da cadeia respiratória), este desempenha uma importante função vasodilatadora junto ao endotélio (ANTONINI e BRUNONI, 1971; WOOD e GRANGER., 2007; PINDER et al, 2009; UYUKLU et al., 2009). O complexo Hb-NO é reversível e a afinidade, apesar de desconhecida, parece ser muito alta (ANTONINI e BRUNONI, 1971; SHIKAMA, 2006).

O grupamento *heme* é formado por quatro anéis pirrólicos (Figura 5 A). Quando o ferro é oxidado, passando para sua forma férrica (Fe^{3+}), a hemoglobina fica impossibilitada de carrear o oxigênio e é denominada de meta-hemoglobina (ANTONINI e BRUNONI, 1971; STRYER, 1999).

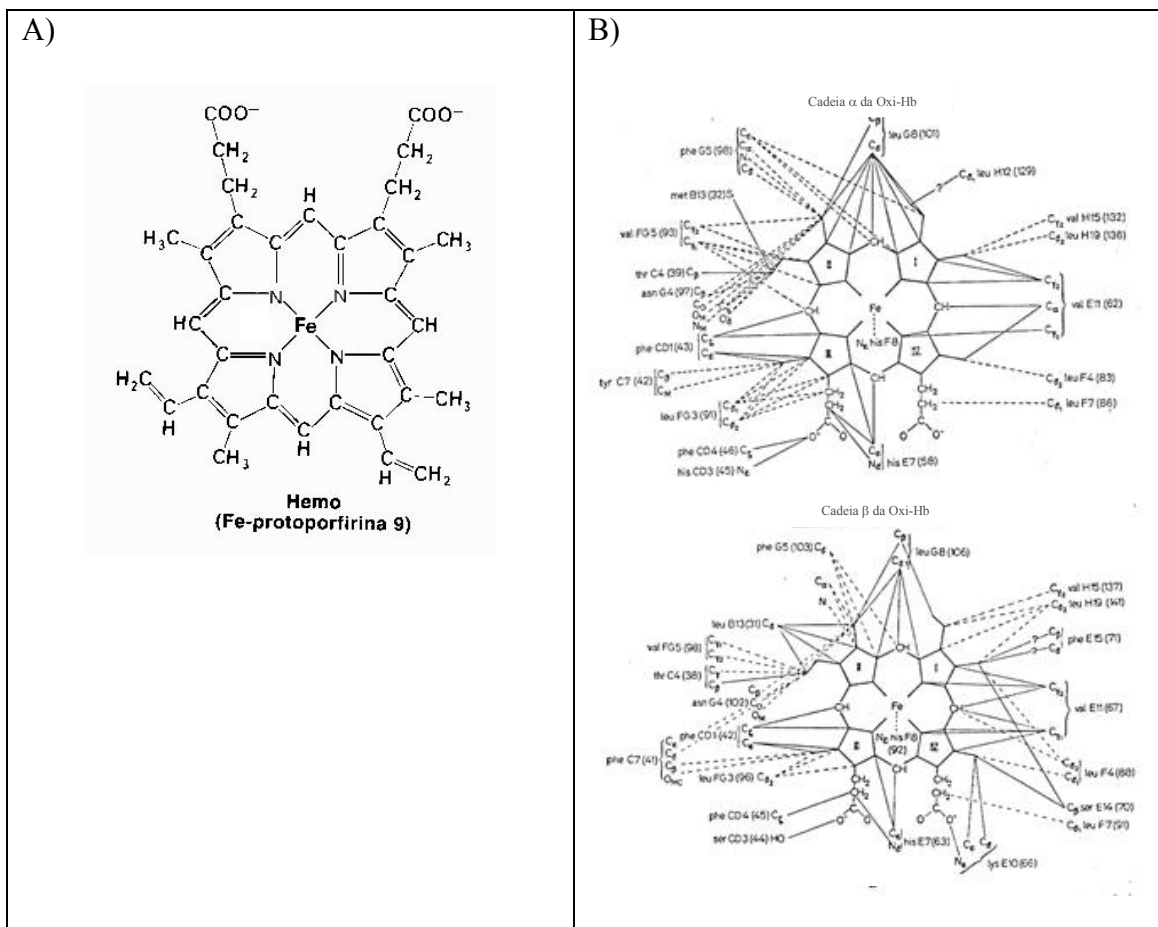


Figura 5. A) Grupamento *heme*. B) Resíduos que interagem com o grupamento *heme* na oxi-Hb (referente à Hb de cavalo) (adaptado de ANTONINI e BRUNONI, 1971).

Conforme demonstrado na Figura 5B o grupamento *heme* apresenta diversas interações que o mantém estável, tanto nas cadeias alfa quanto nas cadeias beta. Já as histidina proximal (E7) e histidina distal (F8), que se ligam ao grupamento *heme*, apresentam papel fundamental na estabilidade deste grupamento, quando da ligação com oxigênio (ANTONINI e BRUNONI, 1971).

Há, na hemoglobina, algumas regiões importantes na estabilização e na função desta proteína como um tetrâmero. Os contatos $\alpha_1\beta_1$ e $\alpha_2\beta_2$, também denominados de *packing*

contacts (os contatos de empacotamento da proteína), compreendem regiões de interações mais fortes, envolvendo muitos resíduos e pontos de interação entre as cadeias; já o contato $\alpha_1\beta_2$ é menos extensivo, e os contatos entre as cadeias são mais fracos (ANTONINI e BRUNONI, 1971; SHIKAMA e MATSUOKA, 2003).

1.3. Propriedade de Ligação com Oxigênio

A ligação da proteína com o grupo *heme* (*heme pocket*) é vital para a capacidade de transportar O_2 e estabilização da molécula inteira. Se a ligação com o *heme* é enfraquecida, as cadeias globínicas se dissociam em dímeros e monômeros (ANTONINI e BRUNONI, 1971; BUNN e FORGET, 1986; STRYER, 1996; SHIKAMA, 2006).

Duas histidinas presentes no bolsão *heme pocket* apresentam papel bastante dinâmico na ligação da porção ferrosa com o oxigênio. São estas as histidinas proximal ($\alpha 87$ (F8) ou $\beta 92$ (F8)), que interagem diretamente com o ferro da protoporfirina IX, e a histidina distal ($\alpha 58$ (E7) ou $\beta 63$ (E7)), que por sua vez interage com o oxigênio ligado ao ferro (Figura 6) (ANTONINI e BRUNONI, 1971; BUNN e FORGET, 1986; SHIKAMA, 2006).

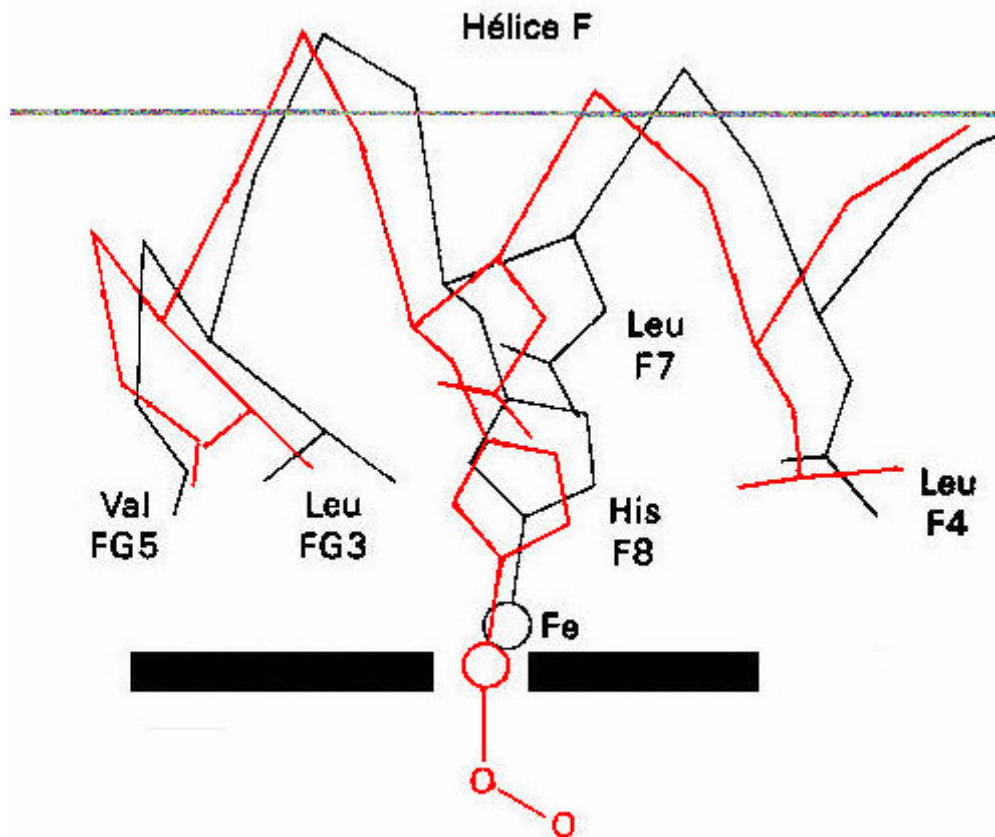


Figura 6. Sobreposição da oxihemoglobina (em vermelho) e desoxihemoglobina (em preto), mostrando as mudanças conformacionais induzidas pelo movimento do átomo de ferro durante o processo de oxigenação. O plano do *heme* está representado pela barra preta (STRYER, 1996).

Conforme pode ser observado na Figura 6, durante a oxigenação o átomo de ferro desloca-se entre 0,55-0,63 Å para fora do plano do *heme*. Esta alteração faz com que todo o restante da cadeia globínica sofra considerável modificação conformacional (Figura 7), permitindo que a hemoglobina apresente suas duas formas básicas termodinamicamente favoráveis: a forma relaxada (R-ligada ao oxigênio) e a forma tensa (T- não ligada ao

oxigênio), descritas por Perutz em 1970, através de cristalografia de Raio X (PERUTZ, 1970; ANTONINI e BRUNONI, 1971).

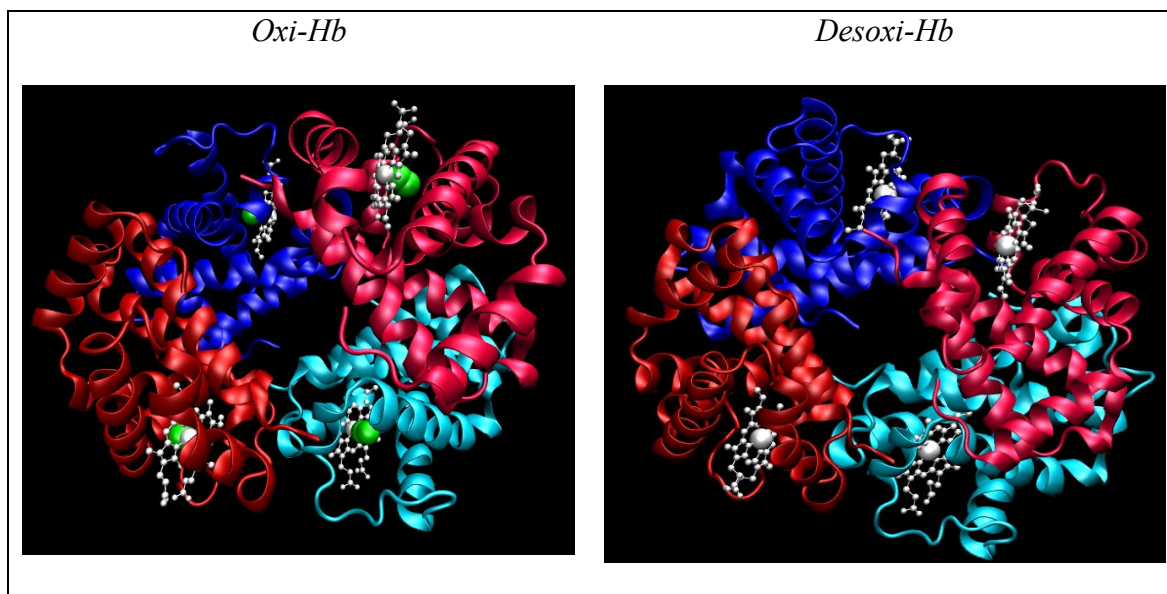


Figura 7. Representação da hemoglobina em suas formas R e T, obtidas através das estruturas 1GXZ (oxi-Hb) e 2DN2 (desoxi-Hb) depositadas no *Protein Data Bank*, visualizadas no *Visual Molecular Dinamycs*.

Perutz, em 1979, ainda propôs que a ligação Hb-O₂ se iniciaria pelas subunidades alfa. Isso porque observou que a subunidade beta apresenta menor afinidade ao oxigênio em relação à alfa, devido à maior proximidade do resíduo Valina E11 ao sítio de ligação no *heme*, o que poderia compor uma barreira física à ligação com o oxigênio.

No instante em que há a ligação de uma subunidade globínica ao oxigênio, através da interação **alostérica homotrópica** entre os grupamentos *heme*, há a mudança conformacional desta subunidade.

Faz-se lembrar que as interações alostéricas consistem na reatividade de um sítio ativo afetado pela presença de um ligante em outro sítio na mesma molécula. Se estes sítios

de mesma natureza sofrem influência do mesmo ligante, ou o mesmo tipo de ligante, as interações são chamadas de *homotrópicas*; se os sítios sofrem interferência de diferentes tipos de ligantes, as interações são chamadas de *heterotrópicas*. O primeiro caso, conforme citado anteriormente, é tipicamente representado pelas interações *heme-heme*, e o segundo pelo Efeito Bohr, o qual deverá ser abordado posteriormente (ANTONINI e BRUNONI, 1971).

A ligação do primeiro oxigênio em seu sítio *heme* facilita a ligação dos outros oxigênios nos sítios da proteína. Este evento pode ser denominado de **cooperatividade**. Através deste fenômeno a hemoglobina apresenta curva de dissociação e ligação com o O₂ de modo sigmoidal, conforme gráfico da Figura 8 (PERUTZ, 1970; ANTONINI e BRUNONI, 1971; PERUTZ et al, 1998; STRYER, 1996; SHIKAMA, 2006; CIACCIO et al., 2008).

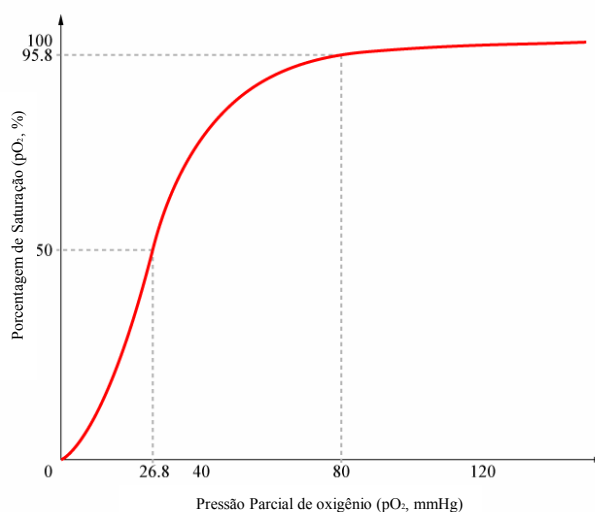


Figura 8. Curva sigmoidal representando o caráter cooperativo da ligação da Hb com o oxigênio (adaptado de Wikipedia Web Page¹).

¹ www.wikipedia.org

A inclinação da reta do gráfico logarítmico de %HbO₂ *versus* pO₂ (Figura 8) permite a determinação do parâmetro de Hill ('*n*') que consiste na medida da interação *heme-heme*, indicativo da cooperatividade entre os quatro sítios de ligação da hemoglobina (Figura 9). Deste modo, valores de *n* = 1, correspondem a curva de dissociação hiperbólica; *n* > 1 a curva sigmóide, assim como interações *heme-heme* positivas. Os valores de *n* para estudos de equilíbrio de oxigênio em hemoglobinas de mamíferos, em condições fisiológicas é 2,8-3,0 (HILL, 1910; ANTONINI e BRUNONI, 1971).

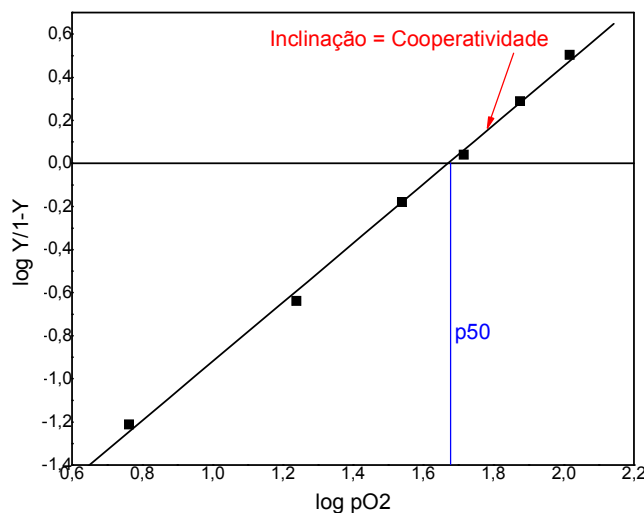
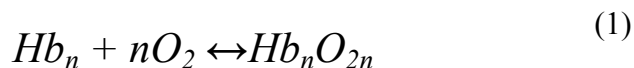


Figura 9. Gráfico de Hill

Para a obtenção deste gráfico é preciso considerar que o equilíbrio da reação de ligação Hb-O₂ se dá da seguinte maneira:



Deste modo, obtém-se a seguinte constante de dissociação:

$$K = \frac{[Hb(O_2)_n]}{[Hb_n][pO_2]^n} \quad (2)$$

que gera a Equação de Hill:

$$K (pO_2)^n = \frac{Y}{1-Y} \quad (3)$$

O valor de sítios ligados (Y) varia de 0 até 1.

Como a constante n é calculada em logaritmo, em função da relação dos sítios ligados (Y) e sítios não ligados (1-Y), temos que:

$$\log\left(\frac{Y}{1-Y}\right) = n \log [O_2] - n \log K \quad (4)$$

Por fim, considerando que a saturação parcial da hemoglobina é mensurada em 50% dos sítios *heme* ligados ($K = (p50)^n$), tem-se que:

$$Y = \frac{(pO_2)^n}{(p50)^n + (pO_2)^n} \quad (5)$$

Deste modo, obtém-se a forma linear, com as devidas substituições na fórmula 5:

$$\log\left(\frac{Y}{1-Y}\right) = n \log pO_2 - n \log p50 \quad (6)$$

conforme curva representada na Figura 9.

1.3.1. Modelos de ligação alostérica

Existem algumas teorias quanto à dinâmica da interação homotrópica entre Hb-O₂. Entretanto, os modelos mais utilizados são os de simetria e o seqüencial.

O primeiro modelo teórico de ligação foi dado por Monod, Wyman e Changeux (modelo MWC), também conhecido como **modelo de simetria**, em 1965 (MONOD et al., 1965; EATON et al., 2007).

Neste modelo, os pesquisadores consideram que há duas formas de apresentação da molécula de Hb: a forma T e a forma R; sendo que o oxigênio liga à hemoglobina mais facilmente quando de sua forma relaxada (R), enquanto que a forma tensa (T) da proteína tem menor afinidade ao ligante. Considera-se, também que todas as cadeias globínicas deverão mudar sua conformação de T→R como uma unidade total, e não cadeia a cadeia, bem como não haveria interferência da afinidade entre globinas (Figura 10). Neste modelo, interações homotrópicas e heterotrópicas alterariam o equilíbrio de ligação Hb-O₂, através das modificações conformacionais estruturais de R à T, num evento de “tudo ou nada”. Deste modo a cooperatividade estaria ligada à interações alostéricas, sem a necessidade da presença do ligante. (MONOD et al., 1965; ANTONINI e BRUNONI, 1971; EATON et al., 2007; RONDA et al., 2008).

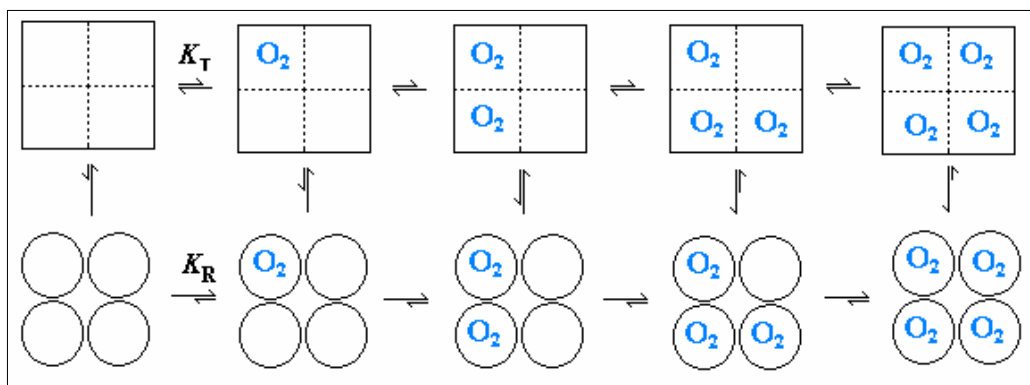


Figura 10. Modelo MWC para a ligação Hb-O₂.

□ = Estado T;

○ = Estado R;

K_T e K_R = constantes de ligação (Adaptado de VOET e VOET, 2004).

Em 1966, Koshland, Nemethy e Filmer propuseram um outro modelo, chamado de **modelo seqüencial** ou KNF.

Neste modelo, os autores propuseram que há modificação seqüencial da conformação $T \rightarrow R$ das cadeias globínicas conforme ocorre a ligação desta com o oxigênio (Figura 11). Outra diferença para o modelo anterior consiste no fato de que considera-se que subunidades interferem na afinidade da outra pelo ligante. Deste modo, a mudança de uma cadeia globínica de $T \rightarrow R$ quando houvesse a ligação com o oxigênio deve interferir na ligação da próxima globina com o ligante, aumentando a afinidade deste, que por sua vez interferiria na próxima interação *heme*-O₂, com afinidade ainda maior em relação à anterior, e assim por diante. Deste modo não deveriam existir constantes de ligação distintas entre R ou T, mas haveria diferentes constantes de ligação, de acordo com a ocupação seqüencial dos grupos *heme* com o ligante (KOSHLAND et al., 1966; EATON et al., 2007; RONDA et al., 2008).

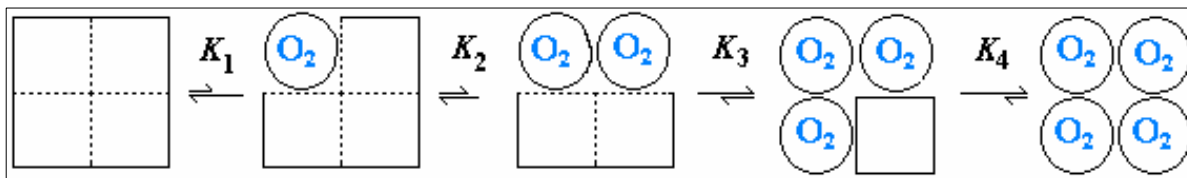


Figura 11. Modelo sequencial simples (KNF), para a ligação Hb-O₂.

□ = Estado T;

○ = Estado R;

K = Constante de Ligação (adaptado de VOET e VOET, 2004).

1.3.2. Moduladores

A ligação cooperativa Hb-O₂ também é modulada quimicamente por interações heterotrópicas (fora do *heme pocket*) por íons H⁺, fosfatos orgânicos como o 2,3 Difosfoglicerato (2,3 DPG), ATP e ADP, e gás carbônico (BENESCH e BENESCH, 1967; CHANUTIN e CURNISH, 1967; CIACCIO et al., 2008; ANTONINI e BRUNONI, 1971; YONETANI e LABERGE, 2008).

a) Efeito Bohr

A presença de íons H⁺ influenciando na afinidade da hemoglobina pelo O₂ é conhecida como Efeito Bohr, o qual pode ser subdividido em alcalino e ácido. No efeito Bohr alcalino, a presença de íons H⁺ reduziria a afinidade, enquanto sua ausência, em pHs mais alcalinos, levaria ao efeito inverso, com o aumento da afinidade (Figura 12). Já o efeito Bohr ácido consistiria no aumento da afinidade em pHs abaixo de 6,0, quando há elevadas concentrações de íons H⁺. Este evento pode também ser chamado de Efeito Bohr reverso. Apesar de, em seres humanos, somente ser observado o efeito Bohr alcalino em função do pH fisiológico, de 7,4, o efeito Bohr ácido também pode ocorrer com a

hemoglobina humana, em pHs inferiores à 6,5. Embora não se saiba se o Efeito Bohr ácido tenha algum papel fisiológico em seres humanos, ele parece estar relacionado ao processo de degradação da hemoglobina nos lisossomos presentes no tecido hepático (BENESCH e BENESCH, 1967; CHANUTIN e CURNISH, 1967; RIGGS, 1988; BONAVENTURA et al., 2004; YOKOYAMA et al., 2004; YONETANI e LABERGE, 2008).

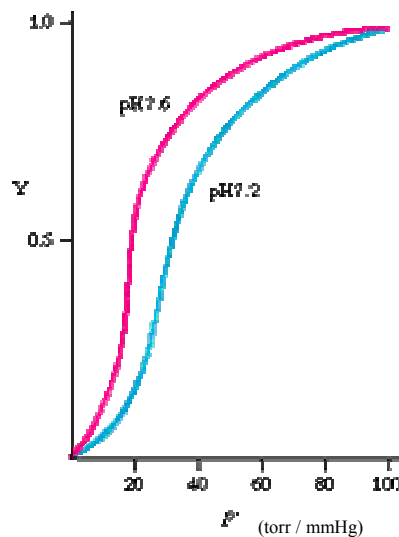


Figura 12. Efeito Bohr alcalino: a diminuição do pH diminui a afinidade da Hb pelo oxigênio (adaptado de HORTON et al., 1996).

b) Fosfatos Orgânicos

Os fosfatos orgânicos, a exemplo do ATP, ADP e, principalmente o 2,3 DPG, interferem na ligação Hb-O₂, reduzindo o grau de interação da proteína com este gás, fazendo com que este seja liberado para os tecidos periféricos (ANTONINI e BRUNONI, 1971; CHANUTIN e CURNISH, 1967; BENESCH e BENESCH, 1967; YONETANI e LABERGE, 2008).

A molécula de 2,3 DPG (2,3 Difosfoglicerato), também chamado de 2,3 BPG (Bifosfoglicerato), tem importante função na liberação do oxigênio carregado pela hemoglobina para os tecidos. Isso porque esta proteína, em seu estado T, expõe as porções positivamente carregadas das cadeias laterais dos resíduos histidina 2 e 143, lisina 82 e os grupos amino terminal da Val1, localizados na interface $\beta_1\beta_2$ (ARNONE, 1972), conforme figura 13. Deste modo o 2,3DPG, cuja estrutura é carregada negativamente, estabiliza tal conformação espacial de hemoglobina, através de sua interação com tais aminoácidos, o que confere a esta molécula importante papel na alteração funcional da hemoglobina (CHANUTIN e CURNISH, 1967; BENESCH e BENESCH, 1967).

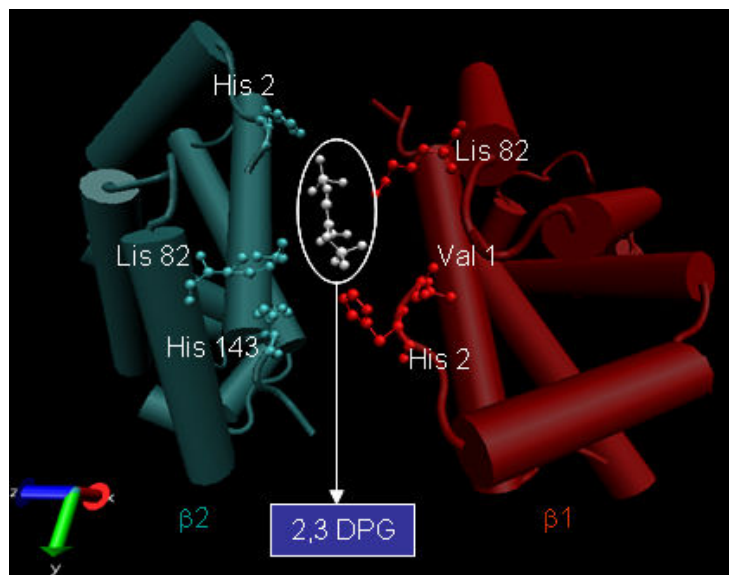


Figura 13. Cadeias β com 2,3 DPG entre elas. Alguns aminoácidos em destaque. (estrutura 1B86 presente no *Protein Data Bank*).

O 2,3 DPG, assim como outros fosfatos orgânicos, apresenta efeitos semelhantes aos prótons, uma vez que está envolvido em interações heterotrópicas entre os sítios do

oxigênio (*heme pocket*) e o de poliânions fosfato. Deste modo atua como efetor alostérico da hemoglobina, reduzindo a afinidade desta proteína pelo oxigênio (ANTONINI e BRUNONI, 1971). Esta interferência, na liberação de oxigênio para os tecidos, é fisiologicamente importante inclusive na adaptação do organismo à diferentes altitudes.

c) Íons Cloreto e outros ânions monovalentes

Ânions cloreto reduzem a afinidade da hemoglobina pelo oxigênio através da estabilização da estrutura protéica na forma Tensa (desoxi). Este fato se deve à exposição de grupamentos positivos de resíduos polares presentes na cavidade central da proteína, quando no estado T. Estes, por sua vez, interagem com íons cloreto e outros ânions, sendo estabilizados e neutralizados através desta interação (PERUTZ et al., 1994).

d) Efeito da Temperatura

A ligação da Hb-O₂ é exotérmica. Tem-se, portanto, que a afinidade da Hb por este gás é diminuída com o aumento da temperatura (BENESCH et al., 1969). O aumento de 10°C diminui a afinidade da hemoglobina pelo oxigênio entre 1,5 a 2,5 vezes, dependendo das condições experimentais (ANTONINI e BRUNONI, 1971).

Os parâmetros de termodinâmica são dados por:

$$\Delta G = - RT \ln K \quad (7)$$

considerando-se que R é a constante universal dos gases (onde R = 1,987 Kcal¹mol⁻¹), T = temperatura (dada em Kelvin) e K é a constante de equilíbrio termodinâmico. ΔG é dado, portanto, em kcal/ mol (ANTONINI e BRUNONI, 1971).

Já a energia livre, proposta por Gibbs, segue a equação:

$$\Delta G = \Delta H - T.\Delta S \quad (8)$$

onde ΔH é a variação da entalpia (energia total do sistema de ligação Hb-O₂ liberada) e ΔS , a variação da entropia (energia dos sistema Hb-O₂ não dissipada) (ANTONINI e BRUNONI, 1971). No caso de reações gasosas os valores de ΔH obtidos pela mudança de pressão com a temperatura incluem o aquecimento do gás em solução (o qual o oxigênio, em temperatura próxima a 20°C tem ΔH em aproximadamente - 3 kcal/mol).

A determinação da mudança de entalpia é dada pela equação de Van't Hoff (equação 9), a qual é amplamente utilizada para Hb. Esta equação implica que o valor de ΔH seja o mesmo para todos os *hemes* da molécula (ANTONINI e BRUNONI, 1971).

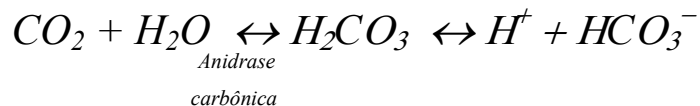
$$\frac{d \ln K}{dT} = \frac{\Delta H^\ominus}{RT^2} \quad (9)$$

A entalpia varia de acordo com o efeito Bohr, entretanto o calor ‘intrínscico’ de oxigenação da Hb de mamíferos está entre -13,5 a -14,5 kcal/mol, o qual, se corrigido para uma solução contendo oxigênio, varia entre -10,5 a -11,5 kcal/mol, sendo que em pH 7,0 o ΔH da hemoglobina humana é de -9,5 Kcal/mol de oxigênio (ANTONINI e BRUNONI, 1971).

e) Efeito do CO₂

A hemoglobina está envolvida no transporte de parte do dióxido de carbono (CO₂) dos tecidos periféricos para os pulmões através de dois mecanismos:

- Efeito Bohr: quando a oxihemoglobina perde o oxigênio e se liga aos íons H⁺ presentes no meio. Em decorrência disso há o aumento do transporte de CO₂, na forma de íons bicarbonato, devido ao deslocamento do equilíbrio de ionização do ácido carbônico, conforme as equações a seguir:



- Formação de compostos carbamino: ocorre diretamente entre o CO₂ e grupos de aminoácidos não protonados (α- ou ε-) da proteína. Através deste mecanismo, a constante de ligação do CO₂ na oxi-Hb e desoxi-Hb são distintas.

O transporte de CO₂ pela hemoglobina não é exclusivamente realizado por nenhum dos mecanismos descritos anteriormente, mas provavelmente por ambos em maior ou menor extensão. Além disso, a hemoglobina somente é responsável por 5% do transporte desta molécula dos tecidos para os pulmões (ANTONINI e BRUNONI, 1971).

1.4. Hemoglobinopatias

As hemoglobinopatias (Hbpatias) hereditárias são um grupo heterogêneo de doenças genéticas causadas por mutações que afetam os genes responsáveis pela síntese ou regulação das cadeias globínicas; elas constituem hoje o maior grupo de doenças genéticas mundialmente distribuídas (BUNN e FORGET, 1986; HOFFBRAND et al., 2000; WILLIAMS et al., 2001) e, genericamente, podem ser classificadas em:

- Alterações estruturais, nas quais ocorre a presença de hemoglobinas estruturalmente anômalas no interior das hemácias;
- Alterações no ritmo de síntese (talassemias), com a supressão parcial ou total da produção de uma ou mais cadeias globínicas;
- Persistência Hereditária da Hemoglobina Fetal (PHHF), que se caracteriza pela produção persistente de cadeias γ durante a vida adulta (BUNN e FORGET, 1986; DACIE e LEWIS, 1995; HOFFBRAND et al., 2000; STEINBERG et al., 2001; WEATHERALL e CLEGG, 2001; WILLIAMS et al., 2001).

A natureza das alterações que afetam os genes de globinas é bastante diversificada e inclui mutações em regiões codificantes, com conseqüente substituição de aminoácido na proteína, mutações no código de terminação, causando a formação de cadeias alongadas e com menor ritmo de síntese, mutações nos *introns* resultando na produção de cadeias truncadas ou de RNAs mensageiros instáveis, na região promotora, com perda ou ativação da expressão gênica e deleções com perda parcial ou total de um ou mais genes no complexo (BUNN e FORGET, 1986; HOFFBRAND et al., 2000; STEINBERG et al., 2001; WEATHERALL e CLEGG, 2001; WILLIAMS et al., 2001).

As Hbpatias estruturais são, geralmente, causadas por mutações de ponto, ou pequenas inserções ou deleções de bases, afetando a região codificadora do gene e causando a substituição de aminoácidos na cadeia protéica². As mais importantes em termos de prevalência na população e gravidade da doença são a Hb S ($\alpha_2\beta_2$ Glu→Val) e a Hb C ($\alpha_2\beta_2$ Glu→Lys) (BUNN e FORGET, 1986; HOFFBRAND et al., 2000; WILLIAMS et al., 2001).

Atualmente, existem mais de 1000 variantes estruturais descritas¹. Uma boa parte delas não está associada a manifestações clínicas ou alterações hematológicas importantes, mas algumas mutações levam a alterações na solubilidade da Hb, na estabilidade estrutural da molécula ou na afinidade pelo oxigênio. Elas podem causar redução da sobrevida média das hemácias em circulação, levando a um quadro clínico de anemia hemolítica de grau variável, ou, no caso de alterações funcionais, levar à policitemia devido à afinidade elevada da proteína variante pelo oxigênio, ocasionando hipóxia tecidual e conseqüente produção compensatória de hemácias, ou à cianose periférica (sintomatologia caracterizada por extremidades arroxeadas - pontas de dedos e lábios, por exemplo - devido à deficiência de oxigenação) em decorrência da diminuída afinidade da Hb pelo oxigênio (BUNN e FORGET, 1986; DACIE e LEWIS, 1995; HOFFBRAND et al., 2000; WILLIAMS et al., 2001).

A maioria das Hbpatias estruturais é detectada por seu comportamento eletroforético ou cromatográfico anômalo, já que a substituição de aminoácidos pode alterar a carga elétrica da proteína. No entanto, em algumas variantes denominadas “silenciosas”, a substituição por aminoácidos de mesma carga leva a uma migração eletroforética ou

¹ <http://globin.cse.psu.edu>

eluição cromatográfica semelhante à da Hb A (BUNN e FORGET, 1986; DACIE e LEWIS, 1995). De fato, a completa caracterização de uma Hb anômala demanda técnicas complementares, como a focalização isoelétrica, a separação das cadeias globínicas, provas de solubilidade, estabilidade e funcionais, além de análises moleculares para identificação da mutação responsável pela variante (BUNN e FORGET, 1986; DACIE e LEWIS, 1995; HOFFBRAND et al., 2000; WILLIAMS et al., 2001).

Sob o ponto de vista funcional, a prova mais importante é a determinação da curva de dissociação do O₂, que expressa a relação entre a pressão parcial de O₂ (pO_2) e a saturação dos sítios ligantes da Hb com o O₂. A afinidade da Hb pelo oxigênio pode ser expressa pelo termo P_{50} , a pressão parcial de O₂ necessária para saturar 50% dos sítios da Hb. Quanto maior a afinidade da Hb pelo oxigênio, menor o P_{50} e vice versa (ANTONINI e BRUNONI, 1971; BUNN e FORGET, 1986; DACIE e LEWIS, 1995). Além de p_{50} , outro parâmetro calculado a partir da curva de dissociação do O₂ é o coeficiente de Hill (n), cujo valor maior que 1 indica cooperatividade entre os sítios de ligação Hb-O₂. Diminuições nos valores de n estão geralmente associados a alterações estruturais da hemoglobina, como ocorre por exemplo com a Hb Coimbra ($\beta 99 \text{ Asp} \rightarrow \text{Glu}$) e Hb Nantes ($\beta 34 \text{ Val} \rightarrow \text{Leu}$), cujos valores de n indicam a diminuição de cooperatividade *heme-heme* (ANTONINI e BRUNONI, 1971; TAMAGNINI et al., 1991; WAJCMAN et al., 2003). (ANTONINI e BRUNONI, 1971; BUNN e FORGET, 1986; TAMAGNINI et al., 1991; DACIE e LEWIS, 1995; BARD et al., 1998; HOFFBRAND et al., 2000; WILLIAMS et al., 2001).

JUSTIFICATIVA

A caracterização funcional das variantes estruturais da hemoglobina faz parte da sua identificação no nível protéico - molecular. Contribui para uma melhor compreensão da fisiopatologia das anemias, policitemias e cianoses, para seu diagnóstico, e para o estabelecimento da relação entre a estrutura e a função das hemoglobinas. O estudo de dinâmica molecular (MD - *Molecular Dynamics*), por se tratar de uma técnica que analisa a relação inter-atômica dos átomos componentes de uma estrutura molecular tem importante papel na complementação de estudos funcionais da hemoglobina. Isso porque permite compreender quais interações atômicas são subtraídas ou acrescentadas à proteína quando há a substituição de um aminoácido. Deste modo a MD auxilia na interpretação dos resultados de afinidade ao oxigênio e cooperação entre as cadeias globínicas, obtidos experimentalmente, através das curvas de dissociação Hb-O₂.

OBJETIVO

O presente trabalho teve como objetivo principal caracterizar o comportamento funcional de algumas variantes da hemoglobina humana, novas ou raras nas proporções encontradas *in vivo*, detectadas no Laboratório de Hemoglobinopatias do Departamento de Patologia Clínica da FCM/UNICAMP (DUARTE et al., 2003; GRIGNOLI et al., 2002; GONÇALVES et al., 1994; WENNING et al., 1999; WENNING et al., 2000; COSTA et al., 2002; KIMURA et al., 2002; FATTORI et al., 2006; SONATI et al., 2006; WEINSTEIN et al., 2006; KIMURA et al., 2008). Adicionalmente, e para duas variantes estudadas (Hb Caruaru ($\beta 122$ Fen $\rightarrow$ Ser) e Hb S-São Paulo($\beta 6$ Glu $\rightarrow$ Val ; $\beta 65$ Lys $\rightarrow$ Glu)) objetivou-se esclarecer o comportamento funcional apresentado por ambas através da Dinâmica Molecular (MD).

MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Variantes da hemoglobina humana

As variantes da hemoglobina humana, caracterizadas sob o ponto de vista funcional estão sumarizadas na Tabela 1:

Tabela 1. Dados analíticos e clínicos das variantes de hemoglobina estudadas.

Hemoglobina Anômala	Características na eletroforese de Hb, HPLC e na eletroforese ácida de cadeias	Percentagem das Hbs no hemolisado total do sangue periférico*	Sintomatologia Clínica
Variantes NOVAS			
<i>Variantes de cadeia alfa</i>			
Hb Boa Esperança ($\alpha 16 \text{ Lys} \rightarrow \text{Thr}$)	Eletroforese alcalina: banda anômala mais rápida que a Hb A; HPLC: eluição na janela de P3; Eletroforese ácida: normal; Eletroforese de cadeias: cadeia α anômala, mais lenta que a normal; RP-HPLC: separação da cadeia anômala (12.55%- $\alpha^{\text{Boa Esperança}}$)	HbBoaEsp = 24,8% Hb A ₂ = 2,1% Hb F = 0,5%	Assintomático
Hb Itapira ($\alpha 30 \text{ Glu} \rightarrow \text{Val}$)	Eletroforese alcalina: banda anômala mais lenta que a Hb A; HPLC: eluição na janela de HbD; Eletroforese ácida: normal; Eletroforese de cadeias: cadeia α anômala, mais lenta que a normal	Hb Itapira = 5,5% Hb A ₂ = 0,7% Hb F = >1%	Assintomático
Hb Bom Jesus da Lapa ($\alpha 30 \text{ Glu} \rightarrow \text{Ala}$)	Eletroforese alcalina: banda anômala mais lenta que a HbA (na posição de HbS); HPLC: eluição conjuntamente à HbA ₂ ; Eletroforese ácida: normal; Eletroforese de cadeias: normal	Hb Bom Jesus da Lapa = 24,8% (concomitante à HbA ₂) HbA ₂ = 3,4% (dosagem manual) Hb F = 0,6%	Assintomático
<i>Variantes de cadeia beta</i>			
Hb Olinda [$\beta 22 (\text{b4}) - 25 (\text{b7})$]	Eletroforese alcalina: banda anômala na mesma posição de HbS; HPLC: eluição conjunta à HbA ₂ ; Eletroforese ácida: normal; Eletroforese de cadeias: normal; Focalização isoeletrica: migração fragmentada em dois pontos isoeletricos- pH 7,58 (3,0%) e pH 7,34 (3,3%); RP-HPLC: normal	Hb Olinda = 10,5% (concomitante à HbA ₂) HbA ₂ = 3,0% (dosagem manual) Hb F = 1,0%	Anemia hemolítica
Hb Caruaru ($\beta 122 \text{ Phe} \rightarrow \text{Ser}$)	Instável; Eletroforese alcalina: padrão eletroforético indistinguível do adulto normal; HPLC: normal; Eletroforese ácida: normal;	Hb Caruaru = % Não determinada HbA ₂ = 4,1% Hb F = 5,0%	Anemia hemolítica

	Eletroforese de cadeias: normal; Focalização isoelétrica: separação da fração normal, com pH 6,8 (25%) RP-HPLC: separação da cadeia anômala (8,78%- β^{Caruaru})		
Hb S-São Paulo ($\beta 6 \text{ Glu} \rightarrow \text{Val}$; $\beta 65 \text{ Lys} \rightarrow \text{Glu}$)	Eletroforese alcalina: banda anômala mais rápida que a HbA; Teste de solubilidade (da HbS): fracamente positivo; HPLC: eluição em janela de HbD; Eletroforese ácida: padrão semelhante à HbS; Focalização Isoelétrica: separação da fração normal, com pH 6,68 (35,2%); RP-HPLC: separação da cadeia anômala (11.47%- $\beta^{\text{S-São Paulo}}$)	Hb S-São Paulo = 29,6% Hb A₂ = 2,7% (dosagem manual) Hb F = 12,3%	Anemia hemolítica
Variantes RARAS e suas associações			
<i>Variantes de cadeia alfa</i>			
Hb Iwata ($\alpha 87 \text{ His} \rightarrow \text{Arg}$)	Eletroforese alcalina: banda mais lenta que HbA₂ e outra mais lenta que Hb A; Eletroforese ácida: normal; HPLC: separação da fração anômala; RP-HPLC: normal; Focalização isoelétrica: separação da fração normal, com pH 7,28 (30,9%)	Hb Iwata = 11,3% Hb A₂ = 1,1% Hb F = 0,4%	Assintomática
Hb Sunshine Seth ($\alpha 94 \text{ Asp} \rightarrow \text{His}$)	Eletroforese alcalina: banda anômala mais lenta que Hb A; HPLC: eluição na janela de desconhecida; Eletroforese ácida: banda entre a posição de HbS e HbC; Eletroforese de cadeias: cadeia α anômala, mais rápida que a normal	HbSun.Seth=15,6% Hb A₂ = 3,9% Hb F = 0,7%	Anemia hemolítica
<i>Variantes da cadeia Beta</i>			
Hb Deer Lodge ($\beta 2 \text{ His} \rightarrow \text{Arg}$)	Eletroforese alcalina: banda mais lenta que Hb A; HPLC: co-eluição com HbA₂.	Hb Deer Lodge = 53,8% (concomitante à HbA₂) Hb A₂ = 2,45% (dosagem manual) Hb F = 0,6%	Assintomático
Hb Deer Lodge + Hb S ($\beta 2 \text{ His} \rightarrow \text{Arg}$) + ($\beta 6 \text{ Glu} \rightarrow \text{Val}$)	Eletroforese alcalina: duas bandas mais lentas que Hb A; HPLC: co-eluição com HbA₂; Eletroforese ácida: banda na posição de HbA e HbS; RP-HPLC: separação das cadeias anômalas (24.05%- β^{S}, 18,19%- $\beta^{\text{Deer Lodge}}$)	Hb Deer Lodge = 54,8% (concomitante à HbA₂) Hb S = 38,1% Hb A₂ = 3,2% Hb F = 5,1%	Anemia microcítica e hipocrômica
Hb G-Siriraj	Instável;	HbG-Siriraj=25,9%	Assintomática

($\beta 7$ Glu $\rightarrow$ Lys)	Eletroforese alcalina: banda mais lenta que a HbA; HPLC: eluição na posição da HbC; Eletroforese ácida: banda na posição da HbC; RP-HPLC: separação da cadeia anômala (12.16%- $\beta^{G-Siriraj}$)	Hb A ₂ = 5,3% Hb F = 0,7%	
Hb G-Siriraj + Hb C ($\beta 7$ Glu $\rightarrow$ Lys) + ($\beta 6$ Glu $\rightarrow$ Lys)	Instável (exceto pelo teste de Corpos de Heinz); Eletroforese alcalina: banda na posição de Hb C e outra mais lenta que Hb A; HPLC: eluição conjunta da Hb anômala com variante HbC; Eletroforese ácida: eluição conjunta das duas variantes como Hb C; RP-HPLC: separação das cadeias anômalas (10,58%- $\beta^{Siriraj}$; 30.87%- β^C); Presença de deformações celulares das hemácias	Hb G-Siriraj + Hb C = 91,5% (concomitante para ambas as variantes de Hb) Hb A ₂ = 5,1% Hb F = 0,5%	Anemia hemolítica
Hb M-Saskatoon ($\beta 63$ His $\rightarrow$ Tyr)	Instável; Eletroforese alcalina: padrão eletroforético indistinguível do adulto normal; HPLC: presença de pequena fração no pico de HbC (produto de degradação da Hb instável?); Eletroforese ácida: normal; Eletroforese de cadeias: normal; Focalização isoeletrica: formação de banda em pH de 6,9	Hb M-Saskatoon = 13,7% Hb A ₂ = 3,1% Hb F = 0,9%	Cianose e anemia hemolítica
Hb Redondo ($\beta 92$ His $\rightarrow$ Asn)	Instável; Eletroforese alcalina: banda anômala na mesma posição de HbC; HPLC: eluição em janela de desconhecido; Eletroforese ácida: normal; Eletroforese de cadeias: normal	Hb Redondo = 13% Hb A ₂ = 4,4% Hb F = 8,2%	Anemia hemolítica
Hb Köln ($\beta 98$ Val $\rightarrow$ Met)	Instável; Eletroforese alcalina: banda na posição da Hb C; Eletroforese ácida: normal; HPLC: separação da fração anômala na posição de Hb C; RP-HPLC: normal; Focalização isoeletrica: separação da fração normal, com pH 7,53 (9,9%)	Hb Köln = 9,1% Hb A ₂ = 3,7% Hb F = 1,3%	Anemia hemolítica
Hb Coimbra ($\beta 99$ Asp $\rightarrow$ Glu)	Eletroforese alcalina: padrão eletroforético indistinguível do adulto normal; HPLC: alargamento na base do pico correspondente à Hb A; Eletroforese ácida: normal;	Hb Coimbra = % Não determinada Hb A ₂ = 3,8% Hb F = 0,8%	Policitemia

	Eletoforese de cadeias: normal; RP-HPLC: separação da cadeia anômala (21.74%- β^{Coimbra})		
Hb Dhonburi + B ^{tal} ($\beta 126 \text{ Val} \rightarrow \text{Gli}$)	Brevemente instável; Eletoforese alcalina: normal; HPLC: normal; Eletoforese ácida: normal; RP-HPLC: separação da cadeia anômala (36.05%- β^{Dhonburi})	Hb Dhonburi = % Não determinada Hb A ₂ = 7,3% Hb F = 7,9%	Anemia hemolítica

* as hemoglobinas foram quantificadas por HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*). Já as dosagens manuais de Hb foram feitas através de eluição das bandas separadas por eletroforese em fita de acetato de celulose e quantificadas por espectrofotometria, conforme metodologia descrita (DACIE e LEWIS, 2006).

4.2. Purificação do hemolisado total

Neste estudo foram utilizadas amostras de sangue total, coletadas em tubos contendo EDTA em concentração de 8% (frascos de hemograma- *Vacurette*[®]).

Para a realização dos estudos funcionais foi necessário obter o hemolisado purificado (*stripped*), livre de contaminantes como a membrana celular e os fosfatos orgânicos intracelulares (a exemplo de 2,3DPG e ATP) (ANTONINI e BRUNONI, 1971). Para tanto, as hemácias foram lavadas com solução salina 0,9%, por três vezes, centrifugando-se as amostras em cada lavagem, a 1.450 x g por 10 minutos. As amostras foram então hemolisadas com água destilada e o estroma celular retirado através de centrifugação a 30.000 x g.

Por fim as amostras foram purificadas em duas colunas de 2cm de diâmetro interno x 30cm de comprimento contendo resina Sephadex G-25 (*Sigma-Aldrich*), cujos pHs eram acertados com solução tampão Hepes (2-[4-(2-Hidroxietil)-1-piperazina] ácido etanosulfônico) 50mM (*Sigma-Aldrich*), sendo uma em pH alcalino (em torno de 8,2), e

outra em pH ácido (em torno de 6,0) - para que houvesse a retirada de contaminantes tais como fosfatos orgânicos e demais interferentes. Ao final da purificação do hemolisado, este apresentava pH em torno de 7,0 (pH ideal para estabilidade das hemoglobinas) - para determinação do coeficiente de extinção (ANTONINI e BRUNONI, 1971).

As concentrações de hemoglobina presentes no hemolisado foram mensuradas através de análise espectrofotométrica (*Espectrofotômetro DU-7, Beckman*), em comprimento de onda de 541nm (no qual a absorbância de 13,8 corresponde à concentração de 1mM/*heme* - conforme coeficiente de extinção da oxiHb, em pH 7,0 a 20°C), para que, enfim, através de diluição da solução “estoque” pudessem ser preparadas as soluções de análise contendo a hemolisado *stripped*, em concentração molar final da solução em 70µM/*heme* (17,5µM/*Hb*) (ANTONINI e BRUNONI, 1971).

4. 3. Experimentos de dissociação de oxigênio

Os experimentos de dissociação de oxigênio foram realizados com soluções cujos pHs variaram de 6,5 a 8,5 (acertados com tampão Hepes 50mM). Para os estudos funcionais na presença de fosfatos orgânicos, acrescentou-se à solução de trabalho o Inositol-hexafosfato (IHP) (*Sigma-Aldrich*), em concentração final de 1mM; este apresenta propriedades físico-químicas similares ao 2,3DPG, ocupa o mesmo sítio ativo desta molécula, porém apresenta a vantagem de se ligar com maior afinidade à Hb do que o 2,3DGP e confere maior estabilidade estrutural às hemoglobinas (ANTONINI e BRUNONI, 1971).

Após a realização desses procedimentos preparatórios, foi realizado o estudo funcional propriamente dito com as variantes da hemoglobina, transferindo-se a solução

preparada para um tonômetro (vidraria específica de boro silicato empregada no estudo de equilíbrio da Hb, composta por cubeta (para leitura óptica), corpo e torneira), conforme demonstrado na Figura 14 (ANTONINI e BRUNONI, 1971; DACIE e LEWIS, 1995).

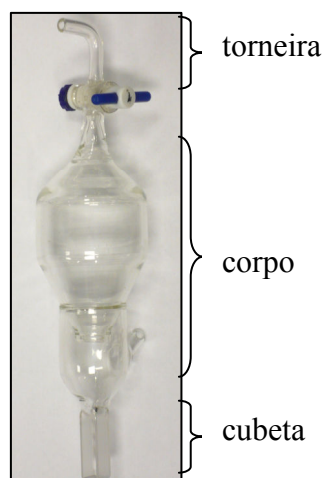


Figura 14. Tonômetro de boro silicato.

Espectrofotometricamente, avaliou-se o estado oxigenado do hemolisado *stripped* nos seguintes comprimentos de onda (Figura 16):

- 541 e 576nm - correspondem aos picos de oxi-Hb;
- 560nm - referente ao pico de desoxi-Hb (que deve ser consideravelmente menor que os anteriores quando no estado de oxi-Hb);
- 569nm - corresponde a um ponto isosbético da Hb (cujas absorbâncias tanto na forma desoxi quanto na sua forma oxi-Hb são as mesmas, ou apresentam valores muito próximos);
- 630 e 690nm – referentes à meta-Hb. Esta leitura somente é efetuada para as amostras em oxi-Hb inicial e final, uma vez que somente verifica se houve deslocamento gráfico em decorrência da formação de meta-Hb.

Em seguida, obteve-se a desoxi-Hb insuflando-se o gás nitrogênio, um gás de arraste que remove o oxigênio residual, com auxílio de agulhas acopladas a este como escape dos gases.

As soluções foram, então, levadas ao banho agitador de tonômetros, sob temperatura controlada de 25,0°C, para homogeneização e estabilização em banho agitador de tonômetros (Figura 15), durante 10 minutos.



Figura 15. Banho agitador de Tonômetros utilizado para equilíbrio do hemolisado *stripped* expostos a adições de ar.

Em seguida, além das referidas leituras espectrofotométricas citadas anteriormente, para garantir a efetiva desoxigenação da proteína, o seguinte cálculo era efetuado, de acordo com Benesch:

$$1,20 < \frac{\text{Abs}_{555}}{\text{Abs}_{540}} \leq 1,24$$

Considerava-se satisfatória a solução cujos valores se aproximassem de 1,24.

Repetidas adições de volumes conhecidos de ar foram feitas aos tonômetros, com auxílio de seringa de vidro, levando-os para sucessivas homogeneizações no banho a 25°C por 10 minutos. Após cada adição de ar e conseqüente homogeneização e estabilização da solução na temperatura descrita, as soluções eram submetidas às leituras espectrofotométricas, nos comprimentos de onda anteriormente citados (Figura 17). Foram efetuadas, em média, seis (6) adições de ar, seguidas por 10 minutos de homogeneização na referida temperatura, para cada amostra.

Deste modo, a hemoglobina em seu estado desoxigenado apresentava aumento da absorbância em 560nm e diminuição dos picos de 541nm e 576nm. Conforme as adições de ar, havia diminuição do pico de 560 nm e gradativo aumento dos picos de 541nm e 576nm, até a obtenção da saturação em torno de 80%. Em seguida o sistema era aberto para obtenção da forma oxigenada final (100% oxigenada).

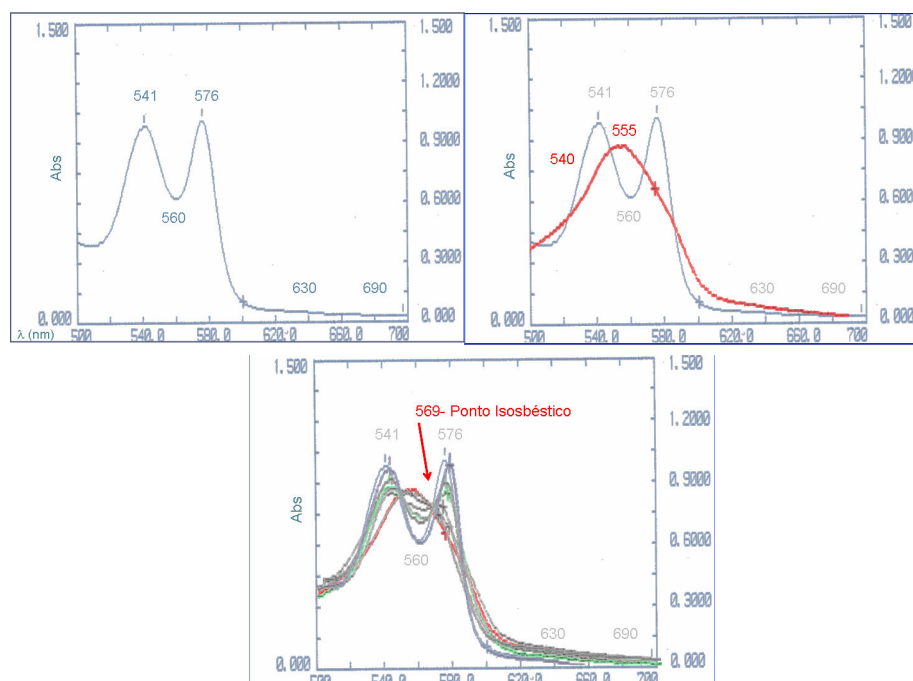


Figura 16. Absorção óptica da oxi-Hb (em azul); desoxi-Hb (em vermelho) e estados intermediários obtidos com seqüentes adições de ar, até oxigenação total. Gráfico em verde corresponde à estimativa para p50.

Estes procedimentos foram realizados com e sem adição de IHP, em pHs que variaram entre 6,5 e 8,0, para cada hemolisado analisado.

Além disso, é preciso ressaltar que nos experimentos realizados não houve adição de cloreto de sódio (NaCl), o qual influencia na cooperatividade das cadeias globínicas. Deste modo, houve a uma diminuição dos valores dos coeficientes de Hill (n), para todos os resultados (proteína nativa e variantes da Hb) (ANTONINI e BRUNONI, 1971).

4.4. Cálculos e construção dos gráficos de Hill

Os resultados espectrofotométricos foram então utilizados para obtenção do gráfico de Hill, no qual considerou-se o seguinte cálculo para obtenção de Y:

$$Y = (Abs_X - Abs_D) / (Abs_o - Abs_D)$$

Sendo que:

- Abs_X = absorbâncias nos comprimentos de onda de 541, 576 e 560nm em cada uma das adições de ar.
- Abs_D = absorbância nos comprimentos de onda de 541, 576 e 560nm, na desoxi-Hb;
- Abs_o = absorbância na oxi-Hb inicial.

Deste modo tem-se, em cada uma das adições de ar, que:

$$Y = \frac{\begin{aligned} &[(Abs_{541x} - FC_x) - (Abs_{541desoxi} - FC_{desoxi})] \\ &[(Abs_{560x} - FC_x) - (Abs_{560desoxi} - FC_{desoxi})] + \\ &[(Abs_{576x} - FC_x) - (Abs_{576desoxi} - FC_{desoxi})] \end{aligned}}{\begin{aligned} &[(Abs_{541oxi} - Abs_{690oxi}) - (Abs_{541desoxi} - FC_{desoxi})] \\ &[(Abs_{560oxi} - Abs_{690oxi}) - (Abs_{560desoxi} - FC_{desoxi})] + \\ &[(Abs_{576oxi} - Abs_{690oxi}) - (Abs_{576desoxi} - FC_{desoxi})] \end{aligned}}$$

O FC_x é um fator de correção para cada uma das adições de ar e o FC_{desoxi} é um fator de correção para forma desoxigenada da hemoglobina. Deste modo considera-se que:

$$FC = Abs_{569}(\text{adição de ar ou desoxi-Hb}) - Abs_{569}(\text{oxi inicial})$$

Os valores de pressão de oxigênio (pO_2) obtidos em cada uma das adições de ar foram convertidos à partir dos volumes conhecidos de ar, através da seguinte equação:

$$pO_2 = \frac{\frac{([O_2] \cdot T_B)}{T_A \cdot (PBC - PV - UR)} \cdot V_I}{V_T - V_A}$$

Neste cálculo são considerados os seguintes parâmetros:

- $[O_2]$ = Concentração percentual de oxigênio na atmosfera= 21%;
- T_B e T_A = Temperatura do banho agitador de tonômetros e Temperatura ambiente;
- PBC = Pressão barométrica corrigida;
- PV = Pressão de vapor de água;
- UR = Umidade relativa;
- V_I = Volume de ar injetado no tonômetro;
- V_A = Volume de amostra;
- V_T = Volume do tonômetro.

O volume dos tonômetros utilizados eram de:- 253,98 mL

- 248,04 mL

- 264,66 mL

- 236,44 mL

- 263,30 mL

Todos estes dados foram calculados por meio de programa computacional desenvolvido pelo Prof. Dr. Gustavo O. Bonilla Rodríguez, do Departamento de Química e Ciência Ambientais- IBILCE- UNESP- São José do Rio Preto, e gentilmente cedido ao nosso laboratório (Figura 17) (BONILLA-RODRIGUEZ et al., 1994):

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
1	versão 1.2 de 12/8/04	INTRODUZIR DADOS BRUTOS ABAIXO (USAR VÍRGULAS E ###)										
2		541	563	569	578	630	680	FC	ar (mL)	ST ar (mL)		
3	OXI INICIAL							0,000				
4	DESOXI							0,000				
5	adição 1							0,000		0		
6	adição 2							0,000		0		
7	adição 3							0,000		0		
8	adição 4							0,000		0		
9	adição 5							0,000		0		
10	adição 6							0,000		0		
11	adição 7							0,000		0		
12	adição 8							0,000		0		
13	adição 9							0,000		0		
14	adição 10							0,000		0		
15	OXI FINAL							0,000				
16	DADOS AUTOMATICAMENTE CORRIGIDOS ABAIXO (NÃO DIGITAR NÚMERO ABAIXO)											
17	oxi inicial	2,000	2,000	0,000	2,000	0,000	0	pO2	log(Si)	Y		
18	desoxi	0,000	0,000		0,000							
19	delta Abs	0,000										
20	#1	0,000	0,000		0,000			#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	
21	#2	0,000	0,000		0,000			#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	
22	#3	0,000	0,000		0,000			#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	
23	#4	0,000	0,000		0,000			#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	
24	#5	0,000	0,000		0,000			#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	
25	#6	0,000	0,000		0,000			#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	
26	#7	0,000	0,000		0,000			#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	
27	#8	0,000	0,000		0,000			#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	
28	#9	0,000	0,000		0,000			#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	
29	#10	0,000	0,000		0,000			#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	
30	OXI FINAL	0,000	0,000		0,000							
31	Vol. Tonômetro (mL)											
32	Vol. Amostra (mL)											
33	Pressão Bar. Corr.											
34	Temp. Banho											
35	Temp. Ar											
36	Pressão vapor											
37	Unidade relativa											

Figura 17. Programa para cálculo de pO₂

Os gráficos de dissociação de oxigênio foram então obtidos na forma logarítmica, a partir de $\log(Y/1-Y) \times \log pO_2$, considerando os parâmetros previamente citados (conforme Figura 9). Obtinha-se, por conseguinte, o valor de p50 e de cooperatividade.

Por fim, o efeito Bohr foi determinado a partir dos valores de p50 encontrados em cada pH analisado.

Os gráficos de Efeito Bohr e de variação do Coeficiente de cooperatividade de ligação Hb-O₂ foram efetuados por meio do programa OriginPro 7.5.

4.5. Dinâmica Molecular

A dinâmica molecular é uma técnica de análise computacional de moléculas, através da qual é possível avaliar as interações entre átomos, por exemplo, em uma proteína, e assim, fazer aprofundados estudos estruturais e de ligação, por conta da análise das interações interatômicas. Através desta metodologia é possível visualizar a conformação espacial de proteínas como a hemoglobina (e suas variantes), auxiliando na interpretação do mecanismo de ligação entre variantes desta proteína e oxigênio. (ALDER e WAINWRIGHT, 1959; MCCAMMON et al., 1977; MOUAWAD et al., 2002; LABERGEAND e YONETANI, 2008; YONETANI e LABERGE, 2008).

Esta técnica foi aplicada somente em algumas das variantes estudadas do ponto vista funcional, as quais sabidamente conferem alterações no quadro clínico dos seus portadores, bem como apresentassem função alterada. Além disso, foram selecionadas aquelas variantes cuja análise prévia de visualização computacional da estrutura nativa não indicasse necessidade de muito tempo para simulação (de verificação das interações interatômicas promovidas pelo resíduo substituído) devido ao posicionamento e interações do resíduo alterado – os quais não sugerissem imediata correlação entre a substituição e as alterações funcionais. Portanto, a prioridade foi dada às variantes novas da hemoglobina, para as quais não havia dados estruturais descritos na literatura. Deste modo, foi feita a MD das Hb Caruaru (β 122 Phe→Ser) e Hb S-São Paulo (β 6 Glu→Val ; β 65 Lys→Glu),

promovendo as referidas substituições de resíduos, e observando, em função do tempo, as novas interações atômicas decorrentes destas trocas.

Neste estudo utilizamos o programa computacional VMD (*Visual Molecular Dynamics*) para visualização e cálculos básicos de dimensionamento estrutural. Os dados de parametrização de campos de forças inter-atômicas e de topologia (estrutura espacial dos átomos da proteína) foram obtidos através do programa CHARMM (*Chemistry at Harvard Molecular Mechanics*). Já as simulações das estruturas mutantes foram realizadas no programa NAMD (*Nanoscale Molecular Dynamics*) a partir de estrutura nativa (na forma R) depositada no *Protein Data Bank*³ (estrutura 1GZX - referente à oxi-Hb).

A caixa de simulação, de $100\text{\AA}^3$, continha 30.000 moléculas de água, bem como 66 íons cloreto e 62 íons sódio. Os experimentos foram realizados a 25°C, sob pressão de 1atm, com tempo de duração de 5ns (Hb S-São Paulo) e 2ns (Hb Caruaru), os quais foram repetidos 5 (cinco) vezes, para verificação da reprodutibilidade dos eventos observados, e feita a média entre os valores encontrados. Em processo preparativo às simulações, diversos procedimentos de relaxação do sistema foram efetuados com a estrutura nativa: inicialmente a proteína foi fixada e somente as águas externas foram postas à interação; em seguida somente os carbonos estruturais ($C\alpha$) foram fixos e as demais estruturas deixadas móveis; e por fim toda a estrutura da proteína foi relaxada.

Estas análises foram realizadas com a colaboração do Grupo de Estudos de Dinâmica Molecular coordenado pelo Prof. Dr. Munir Salomão Skaf, do Depto. de Físico-Química do Instituto de Química da Unicamp.

³ www.rcsb.org

RESULTADOS

As medidas funcionais obtidas a partir do hemolisado total dos portadores de cada variante foram comparadas a resultados encontrados com hemolisado total normal (composto por Hb A₁, Hb A₂ e Hb F – o qual apresenta aproximadamente 95% de Hb A₁, 2% de Hb A₂ e menos de 1% de Hb F), conforme constam a seguir:

5.1. Variantes Novas

5.1.1. Variantes de Globina Alfa

a) Hb Boa Esperança ($\alpha 16 \text{ Lys} \rightarrow \text{Thr}$)

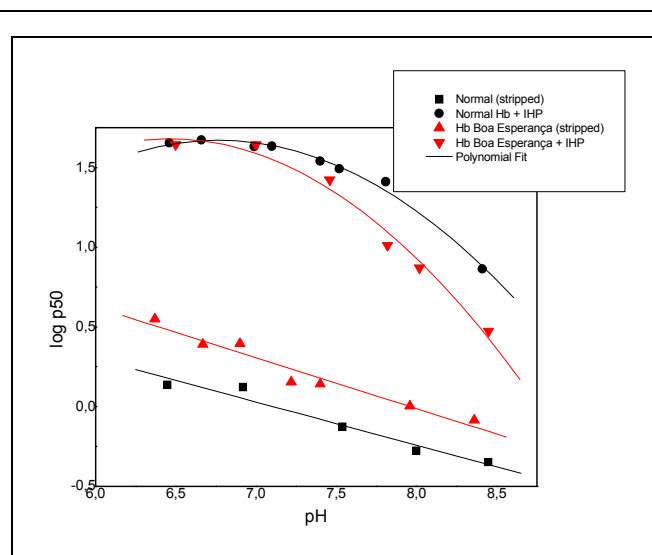


Figura 18. Variação da afinidade Hb-O₂ em função do pH
(Efeito Bohr) - Hb Boa Esperança

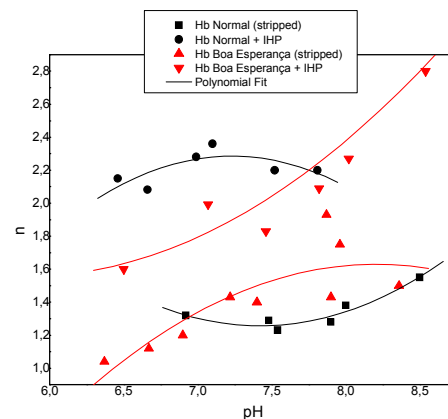


Figura 19. Variação de cooperatividade da ligação
Hb-O₂ (coeficiente de Hill, n) em função do pH –
Hb Boa Esperança.

Tabela 2. Resultados quantitativos de Afinidade, Cooperatividade e Efeito Bohr para a Hb Boa Esperança.

		Hb Boa Esperança	Hb normal
Afinidade – log p50 (pH 7,4)	<i>Stripped</i>	0,18	-0,08
	IHP	1,40	1,56
Cooperatividade Média (<i>n</i>)	<i>Stripped</i>	1,43	1,34
	IHP	2,10	2,20
Efeito Bohr	<i>Stripped</i>	0,32	0,24
	IHP	0,30	0,41

Resultado A) Hb Boa Esperança

Composição do hemolisado total: Hb Boa Esperança = 24,8%

Hb A₁ = 72,6%

Hb A₂ = 2,1%

Hb F = 0,5%

A Hb Boa Esperança ($\alpha 16 \text{ Lys} \rightarrow \text{Thr}$), *in vivo*, na proporção de aproximadamente 25% da hemoglobina total, não resultou em alterações clínicas, uma vez que seu portador é assintomático (doador de sangue), conforme consta na Tabela 1. Apresentou, entretanto, considerável alteração funcional *in vitro*, com menor afinidade pelo oxigênio quando do hemolisado no estado *stripped* – Figura 18. O mesmo não foi observado quando houve a adição de IHP – Figura 18: nestas condições, a Hb Boa Esperança apresentou afinidade aumentada pelo oxigênio, com ligeira diminuição do Efeito Bohr (Tabela 2). Já a cooperatividade pareceu estar ligeiramente diminuída nos pHs mais ácidos, tanto no estado *stripped*, quanto com adição de IHP (Figura 19), embora a cooperatividade média seja considerada normal.

b) Hb Itapira ($\alpha 30 \text{ Glu} \rightarrow \text{Val}$) e Hb Bom Jesus da Lapa ($\alpha 30 \text{ Glu} \rightarrow \text{Ala}$)

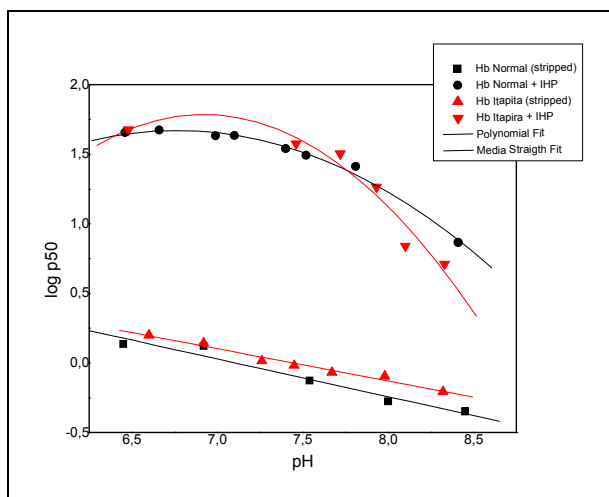


Figura 20. Variação da afinidade Hb-O₂ em função do pH
(Efeito Bohr) – Hb Itapira

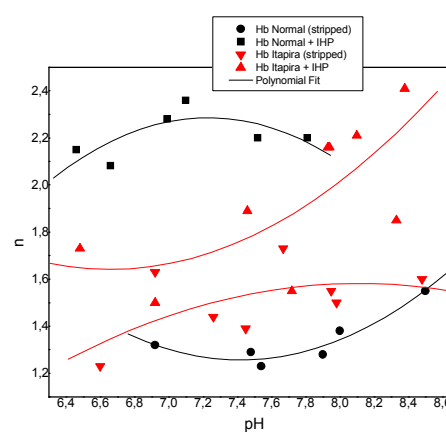


Figura 21. Variação de cooperatividade da
ligação Hb-O₂ (coeficiente de Hill, n) em
função do pH – Hb Itapira.

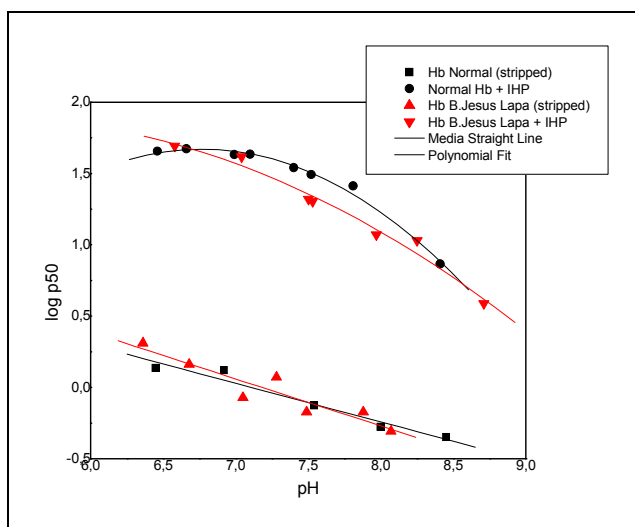


Figura 22. Variação da afinidade Hb-O₂ em função do pH
(Efeito Bohr) – Hb Bom Jesus da Lapa.

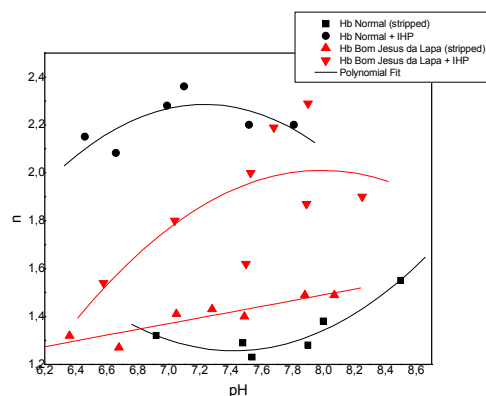


Figura 23. Variação de cooperatividade da
ligação Hb-O₂ (coeficiente de Hill, n) em
função do pH- Hb Bom Jesus da Lapa.

Tabela 3. Resultados quantitativos de Afinidade, Cooperatividade e Efeito Bohr para as Hb Itapira e Hb Bom

Jesus da Lapa.

		Hb Itapira	Hb Bom Jesus da Lapa	Hb normal
Afinidade - logp50 (pH 7,4)	<i>Stripped</i>	0,01	-0,07	-0,08
	IHP	1,65	1,40	1,56
Cooperatividade Média (n)	<i>Stripped</i>	1,51	1,40	1,34
	IHP	1,94	1,90	2,20
Efeito Bohr	<i>Stripped</i>	0,24	0,22	0,24
	IHP	0,52	0,52	0,41

Resultado B) Hb Itapira e Hb Bom Jesus da Lapa

Composição do hemolisado total: Hb Itapira = 5,5%
(Hb Itapira) Hb A₁ = 92,8% (valor estimado)
Hb A₂ = 0,7%
Hb F = % não quantificada

Composição do hemolisado total: Hb Bom Jesus da Lapa = 24,8% (concomitante à (Hb Bom Jesus da Lapa) HbA₂)
Hb A₁ = 71,2%
Hb A₂ = 3,4% (dosagem manual)
Hb F = 0,6%

Os portadores das Hbs Itapira ($\alpha 30$ Glu→Val) e Bom Jesus da Lapa ($\alpha 30$ Glu→Ala) também são assintomáticos e apresentam estas variantes nas concentrações de 5,5% e 24,8% (em concomitância com a HbA₂), respectivamente.

A pequena percentagem de Hb Itapira se deve, possivelmente, à associação da mutação com a triplicação dos genes α . Ou seja, todos os portadores desta variante na família estudada possuem 5 genes α (genótipo $\alpha\alpha/\alpha\alpha\alpha$) e a mutação responsável pela variante, muito provavelmente, encontra-se no haplótipo triplicado.

A afinidade pelo oxigênio destas variantes, nas proporções em que foram encontradas, pode ser considerada normal (Figuras 20 e 22), apesar de uma discreta alteração no efeito Bohr de ambas, na presença de IHP (Tabela 3), com pequenas mudanças na afinidade da Hb pelo O₂ em distintos pHs (Figuras 20 e 22). Já a cooperatividade *heme-heme* mostrou-se, em ambas as variantes, ligeiramente aumentada no estado *stripped* e diminuída após adição de IHP (Figuras 21 e 23), sem, no entanto, comprometer a função normal das variantes em sua média final (Tabela 3).

5.1.2. Variantes de Globina Beta

c) Hb Olinda [$\beta 22$ (b4) –25 (b7)]

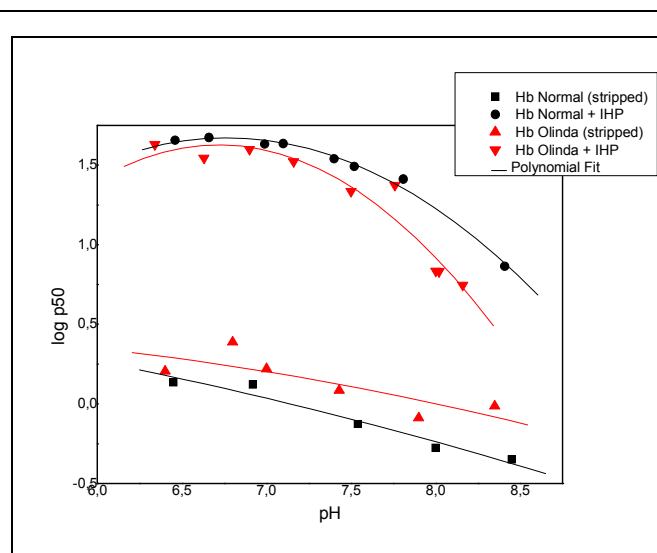


Figura 24. Variação da afinidade Hb-O₂ em função do pH
(Efeito Bohr) – Hb Olinda.

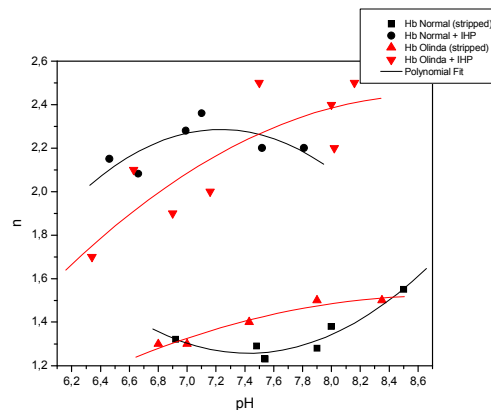


Figura 25. Variação de cooperatividade da
ligação Hb-O₂ (coeficiente de Hill, n) em
função do pH – Hb Olinda.

Tabela 4. Resultados quantitativos de Afinidade, Cooperatividade e Efeito Bohr para a Hb Olinda.

		Hb Olinda	Hb normal
Afinidade - logp50 (pH 7,4)	<i>Stripped</i>	0,13	-0,08
	IHP	1,43	1,56
Cooperatividade Média (n)	<i>Stripped</i>	1,45	1,34
	IHP	2,11	2,20
Efeito Bohr	<i>Stripped</i>	0,27	0,24
	IHP	0,49	0,41

Resultado C) Hb Olinda

Composição do hemolisado total: Hb Olinda = 10,5% (concomitante à HbA₂)
Hb A₁ = 85,5%
Hb A₂ = 3,0% (dosagem manual)
Hb F = 1,0%

Esta variante de hemoglobina perdeu quatro aminoácidos (-Glu-Val-Gly-Gly) entre as posições 23 a 26 da cadeia beta, em decorrência da deleção de 12 nucleotídeos (-GAAGTTGGTGGT) no exon I do gene da globina beta, o que lhe conferiu alta instabilidade, conforme testes de instabilidade demonstrados na Tabela 1 (instabilidade esta por adição de álcoois e reagentes oxidantes, bem como alterações na temperatura).

Apesar disso, esta proteína foi passível de ser estudada do ponto de vista funcional, demonstrando discreta redução da afinidade pelo oxigênio quando em seu estado *stripped* e aumento da afinidade em pHs mais alcalinos quando adicionado IHP (Figura 24), razão do pequeno aumento observado no efeito Bohr nesta condição (Tabela 3).

Interessante notar que a cooperatividade, apesar de normal no estado *stripped*, apresentou o seguinte comportamento quando da adição do fosfato orgânico: menor cooperatividade em pHs mais ácidos e maior cooperatividade em pHs mais alcalinos (Figura 25). Na média final, a cooperatividade foi normal (Tabela 3).

d) Hb Caruaru ($\beta 122 \text{ Phe} \rightarrow \text{Ser}$)

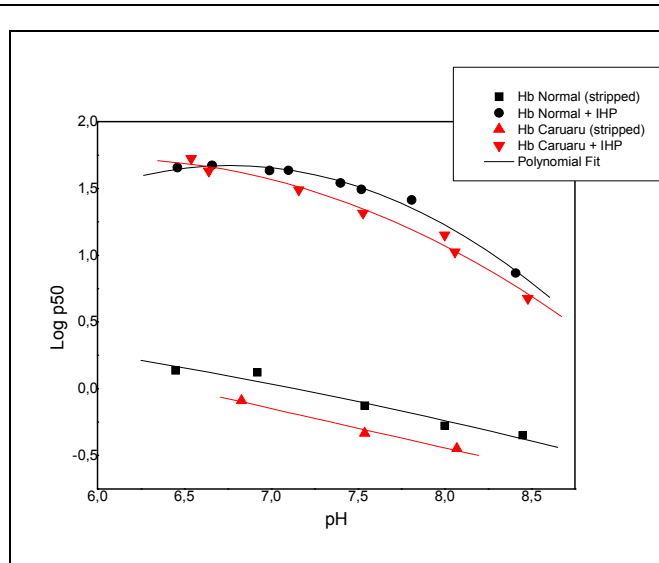


Figura 26. Variação da afinidade Hb-O₂ em função do pH
(Efeito Bohr) – Hb Caruaru.

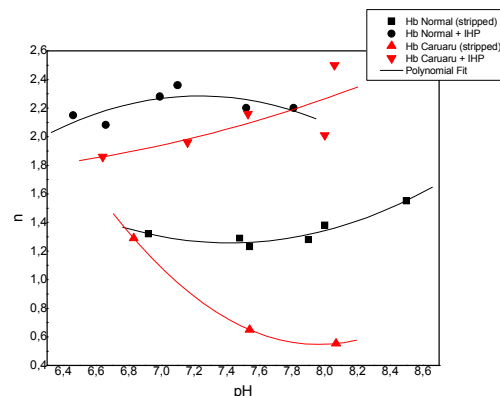


Figura 27. Variação de cooperatividade da
ligação Hb-O₂ (coeficiente de Hill, n) em
função do pH – Hb Caruaru.

Tabela 5. Resultados quantitativos de Afinidade, Cooperatividade e Efeito Bohr para a Hb Caruaru.

		Hb Caruaru	Hb normal
Afinidade – logp50 (pH 7,4)	<i>Stripped</i>	-0,29	-0,08
	IHP	1,41	1,56
Cooperatividade Média (n)	<i>Stripped</i>	0,83	1,34
	IHP	2,10	2,20
Efeito Bohr	<i>Stripped</i>	0,29	0,24
	IHP	0,44	0,41

Resultado D) Hb Caruaru

Composição do hemolisado total: Hb Caruaru = % Não determinada
Hb A₂ = 4,1%
Hb F = 5,0%

A caracterização funcional da Hb Caruaru ($\beta 122$ Phe $\rightarrow$ Ser) indicou que esta variante apresenta uma afinidade pelo O₂ discretamente aumentada quando no estado *stripped*. Este evento, apesar de atenuado quando adicionado o IHP, se manteve, principalmente nos pHs acima de 7,0 – Figura 26. Em contrapartida, a cooperatividade (n) foi inexistente sem a adição de IHP – Figura 27 e Tabela 5. Ainda seguindo o mesmo padrão de tendência à normalidade observado nos resultados de afinidade pelo oxigênio, a cooperatividade também pode ser considerada normal quando há adição de IHP. Já a interação com íons presentes no meio (efeito Bohr) desta variante parece estar aumentado quando do hemolisado *stripped* (Tabela 5).

e) Hb S-São Paulo ($\beta 6 \text{ Glu} \rightarrow \text{Val}$; $\beta 65 \text{ Lys} \rightarrow \text{Glu}$)

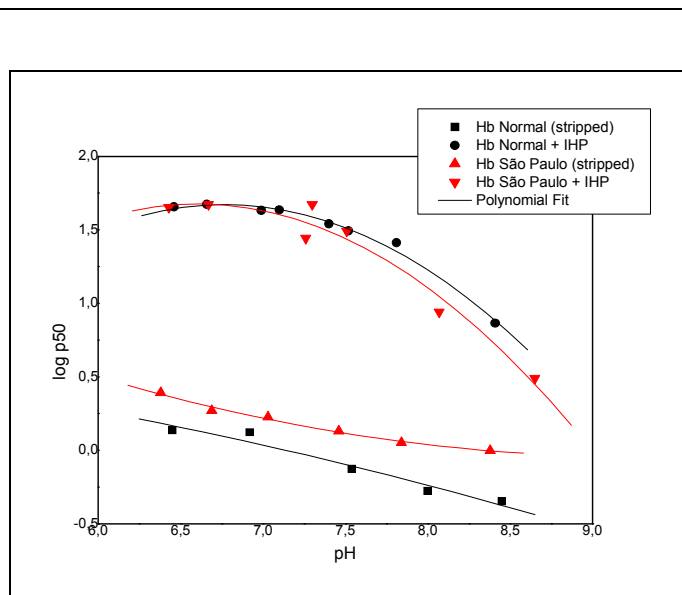


Figura 28. Variação da afinidade Hb-O₂ em função do pH

(Efeito Bohr) – Hb S-São Paulo.

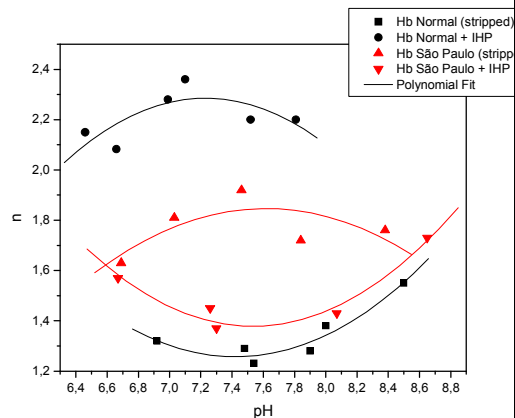


Figura 29. Variação de cooperatividade da ligação Hb-O₂ (coeficiente de Hill, n) em função do pH – Hb S-São Paulo.

Tabela 6. Resultados quantitativos de Afinidade, Cooperatividade e Efeito Bohr para a Hb S-São Paulo.

		Hb S-São Paulo	Hb normal
Afinidade - logp50 (pH 7,4)	<i>Stripped</i>	0,14	-0,08
	IHP	1,49	1,56
Cooperatividade Média (n)	<i>Stripped</i>	1,46	1,34
	IHP	1,73	2,20
Efeito Bohr	<i>Stripped</i>	0,20	0,24
	IHP	0,60	0,41

Resultado E) Hb S-São Paulo

Composição do hemolisado total: Hb S-São Paulo = 29,6%
Hb A₁ = 55,4%
Hb A₂ = 2,7% (dosagem manual)
Hb F = 12,3%

A Hb S-São Paulo proteína é composta por duas substituições na mesma cadeia beta (Glu→Val na posição 6 - referente à HbS, e Lys→Glu na 65ª posição). Combinadas, estas alterações conferem função alterada à proteína, com redução da afinidade pelo oxigênio quando de seu estado *stripped* (Figura 28).

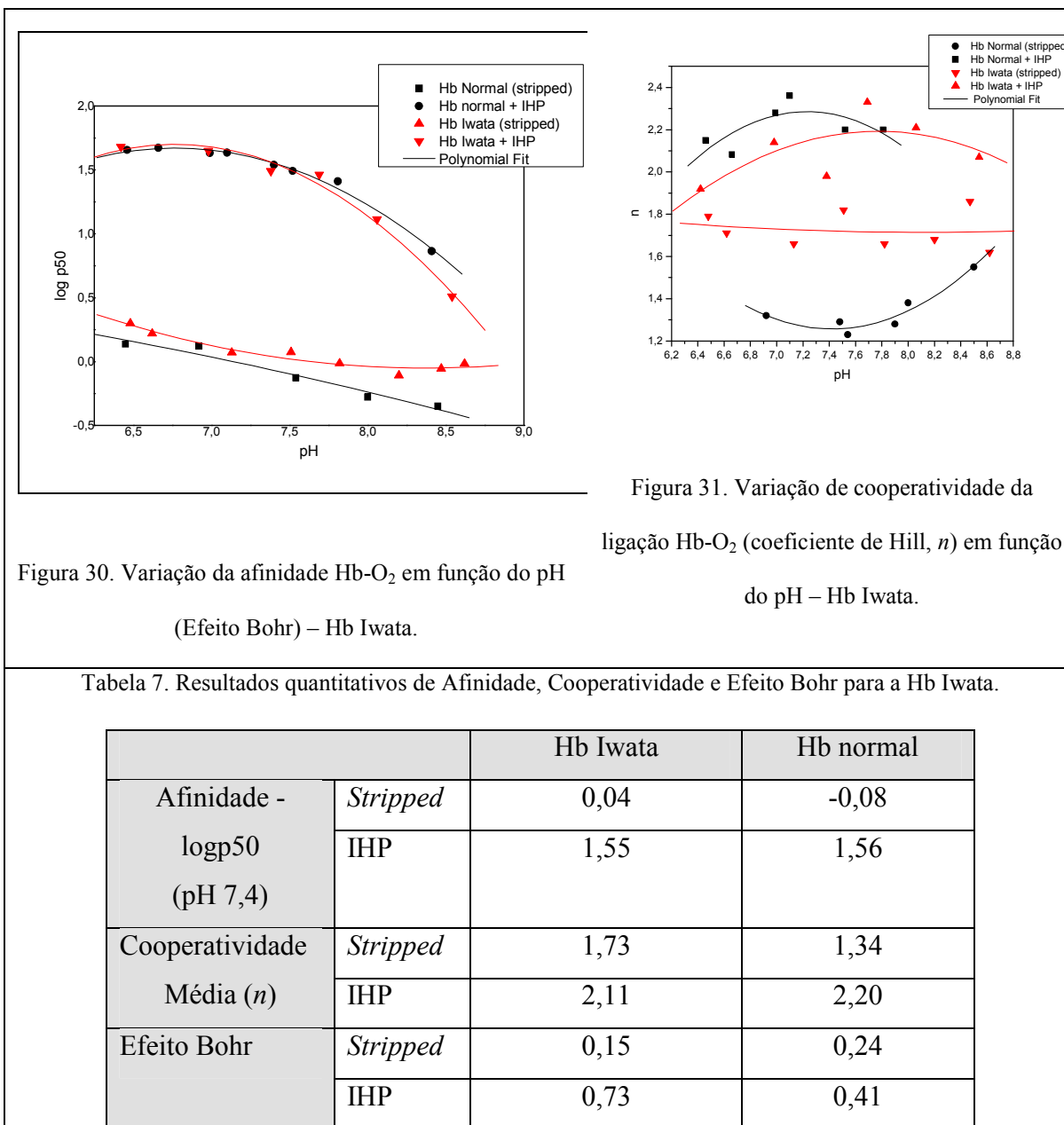
A discreta diminuição do efeito Bohr observada no estado *stripped* (Tabela 6) resulta da maior redução da afinidade da variante pelo oxigênio em pH 8,5. Entretanto, quando adicionado IHP, este evento foi mais acentuado (resultando no considerável aumento do efeito Bohr), também em decorrência da influência do pH mais alcalino. Neste caso, no entanto, houve pequeno aumento da afinidade da variante pelo oxigênio somente nos pHs entre 8,0 e 8,6 (Figura 29).

Por fim, a cooperatividade do hemolisado *stripped* foi normal. Porém, os valores de cooperatividade (n) foram diminuídos, na presença de IHP, tanto no cálculo de média de cooperatividade (Tabela 6), quanto na análise gráfica individualizada por pH (Figura 29).

5.2.Variantes Raras

5.2.1.Variantes de Globina Alfa

f) Hb Iwata (α 87 His→ Arg)



Resultado F) Hb Iwata

Composição do hemolisado total: Hb Iwata = 11,3%

$$Hb A_1 = 87,2\%$$

$$Hb A_2 = 1,1\%$$

$$Hb F = 0,4\%$$

A Hb Iwata (α 87 His $\rightarrow$ Arg) resulta da troca da histidina proximal de uma das cadeias alfa (*heme pocket*) por arginina, por conta da mutação em apenas em somente um dos quatro genes alfa. Apesar da reduzida percentagem expressa no portador (11,3%), os estudos funcionais foram anormais, com significativa redução da afinidade pelo O₂ (na ausência de IHP), principalmente nos pHs mais alcalinos ($\geq$ pH7,75)- Gráfico 30. Consequentemente, houve diminuição do efeito Bohr neste estado (Tabela 7). Quando adicionado IHP, por sua vez, houve pequeno aumento da afinidade justamente nos pHs mais alcalinos (em torno de 8,5), o que culminou com o efeito Bohr aumentado. Além disso, o valor de cooperatividade (em estado *stripped*) foi maior em relação à HbA, independentemente das variações de pH do meio, com um comportamento linear. A adição de IHP, por sua vez, provocou breve da cooperatividade nos pHs mais ácidos (pH < 7,5) - Figura 31 e Tabela 7.

g) Hb Sunshine Seth ($\alpha 94 \text{ Asp} \rightarrow \text{His}$)

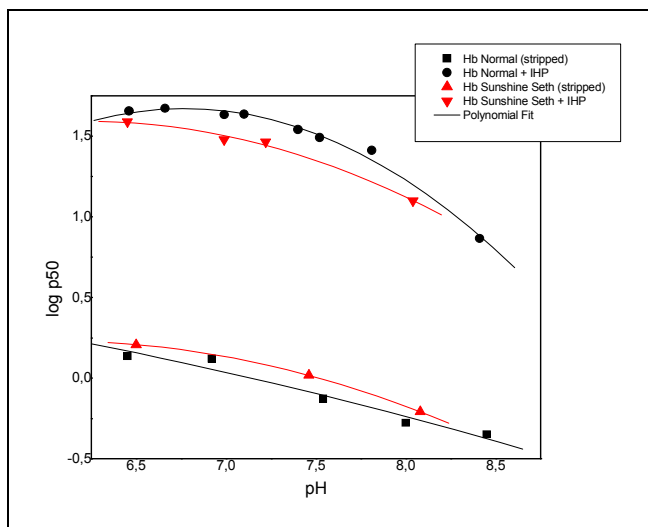


Figura 32. Variação da afinidade Hb-O₂ em função do pH
(Efeito Bohr) – Hb Sunshine Seth.

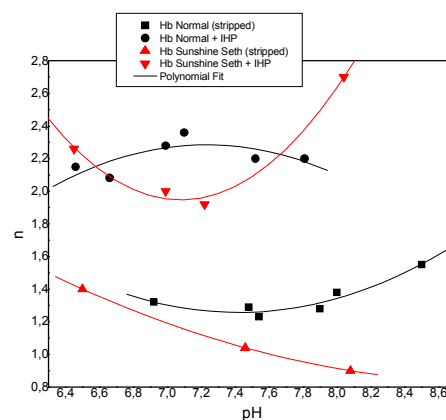


Figura 33. Variação de cooperatividade da
ligação Hb-O₂ (coeficiente de Hill, n) em
função do pH – Hb Sunshine Seth.

Tabela 8. Resultados quantitativos de Afinidade, Cooperatividade e Efeito Bohr para a Hb Sunshine Seth.

		Hb Sunshine Seth	Hb normal
Afinidade - logp50 (pH 7,4)	<i>Stripped</i>	0,04	-0,08
	IHP	1,39	1,56
Cooperatividade Média (n)	<i>Stripped</i>	1,11	1,34
	IHP	2,22	2,20
Efeito Bohr	<i>Stripped</i>	0,25	0,24
	IHP	0,73	0,41

Resultado G) Hb Sunshine Seth

Composição do hemolisado total: Hb Sunshine Seth = 15,6%
Hb A₁ = 79,8%
Hb A₂ = 3,9%
Hb F = 0,7%

Consta, na literatura, que a Hb Sunshine Seth ($\alpha 94$ Asp $\rightarrow$ His) tem afinidade diminuída pelo oxigênio quando isolada da fração normal, o que levaria, *in vivo*, à cianose (BARD et al., 1998). Entretanto, de nosso conhecimento, não há estudos desta variante nas proporções encontradas *in vivo*, ou mesmo com adição de IHP.

De acordo com os resultados aqui obtidos, a Hb Sunshine Seth ($\alpha 94$ Asp $\rightarrow$ His), nas proporções encontradas no portador estudado (15,6%), apesar de apresentar afinidade ligeiramente diminuída pelo oxigênio quando em hemolisado *stripped*, revelou um certo aumento de afinidade quando da adição de IHP, em relação à Hb nativa (Figura 32). O Efeito Bohr, neste caso, também esteve alterado (Tabela 8), com aumento do seu valor final. Em contrapartida, a cooperatividade entre as cadeias globínicas apresentou uma tendência à normalidade (Figura 33 / Tabela 8).

5.2.2. Variantes de Globina Beta

h) Hb Deer Lodge ($\beta 2 \text{ His} \rightarrow \text{Arg}$)

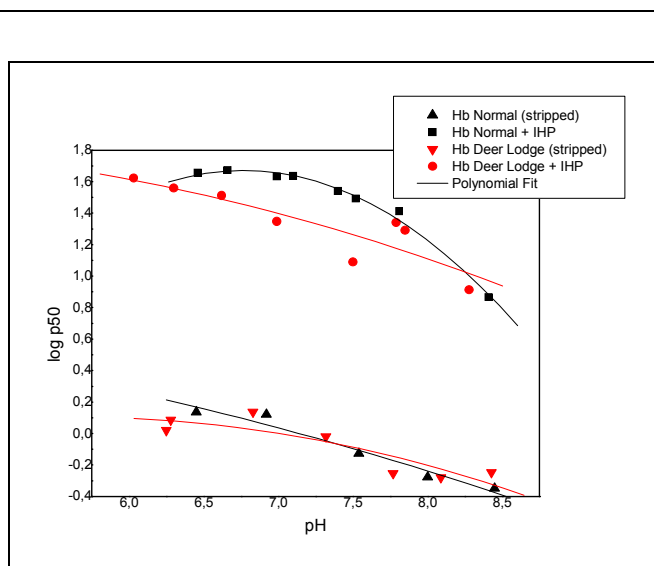


Figura 34. Variação da afinidade Hb-O₂ em função do pH

(Efeito Bohr) – Hb Deer Lodge.

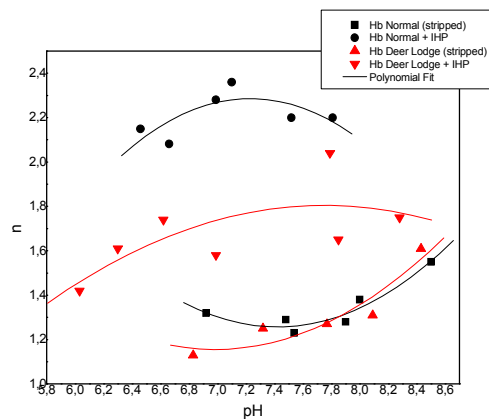


Figura 35. Variação de cooperatividade da ligação Hb-O₂ (coeficiente de Hill, n) em função do pH- Hb Deer Lodge.

Tabela 9. Resultados quantitativos de Afinidade, Cooperatividade e Efeito Bohr para a Hb Deer Lodge.

		Hb Deer Lodge	Hb normal
Afinidade - logp50 (pH 7,4)	<i>Stripped</i>	-0,07	-0,08
	IHP	1,29	1,56
Cooperatividade Média (n)	<i>Stripped</i>	1,31	1,34
	IHP	1,69	2,20
Efeito Bohr	<i>Stripped</i>	0,12	0,24
	IHP	0,32	0,41

Resultado H) Hb Deer Lodge

Composição do hemolisado total: Hb Deer Lodge = 53,8% (concomitante à HbA₂)
Hb A₁ = 45,6% (valor estimado)
Hb A₂ = 2,45% (dosagem manual)
Hb F = 0,6%

A substituição de aminoácido na Hb Deer Lodge ($\beta 2$ His $\rightarrow$ Arg) ocorre no sítio de ligação com 2,3 Difosfoglicerato (2,3DPG), o que ocasiona, do ponto de vista funcional, aumento da afinidade pelo oxigênio, diminuição da cooperatividade e ligeiro aumento do Efeito Bohr (BONAVENTURA et al., 1975). Entretanto, na proporção encontrada no portador estudado (53,8%, em concomitância à HbA₂) demonstrou tal aumento na afinidade somente após a adição de IHP, em pHs entre 6,5 e 7,5 (Figura 34), assim como em pH < 6,5 quando no estado *stripped*.

Deste modo, verifica-se a importância de quantificar a concentração da variante no hemolisado final. Isso porque a percentagem da proteína (<100%) também pode ter resultado numa cooperatividade normal observada no hemolisado *stripped*. A diminuição da cooperatividade *heme-heme*, deste modo, foi somente notada quando da adição de IHP (Figura 35 e Tabela 9). Já o efeito Bohr, diferentemente dos resultados encontrados anteriormente, esteve diminuído, em ambos os estados (Tabela 9).

i) Hb Deer Lodge ($\beta 2 \text{ His} \rightarrow \text{Arg}$) + Hb S ($\beta 6 \text{ Glu} \rightarrow \text{Val}$)

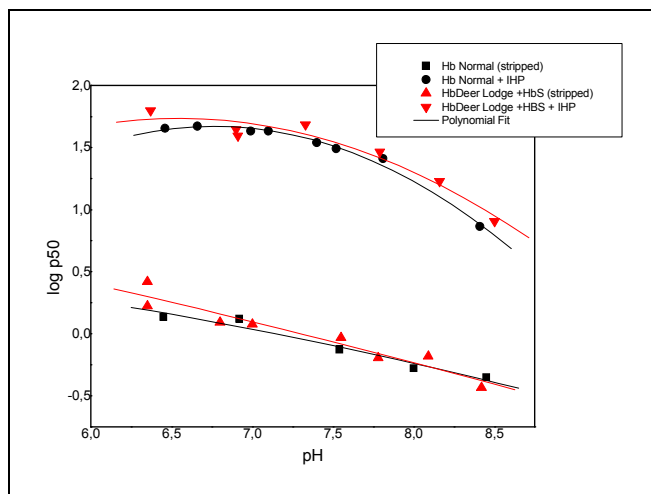


Figura 36. Variação da afinidade Hb-O₂ em função do pH
(Efeito Bohr) – Hb Deer Lodge + Hb S.

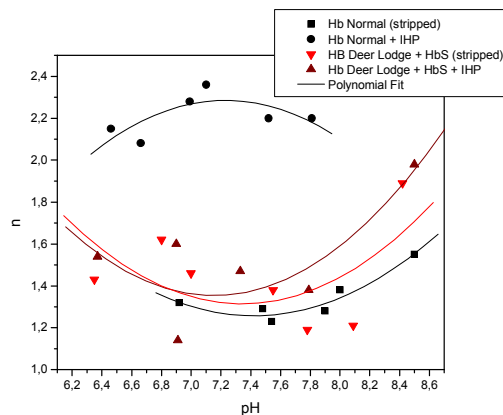


Figura 37. Variação de cooperatividade da
ligação Hb-O₂ (coeficiente de Hill, n) em função
do pH – Hb Deer Lodge + Hb S.

Tabela 10. Resultados quantitativos de Afinidade, Cooperatividade e Efeito Bohr para a
Hb Deer Lodge + Hb S.

		Hb Deer Lodge + Hb S	Hb normal
Afinidade - logp50 (pH 7,4)	<i>Stripped</i>	0,07	-0,08
	IHP	1,58	1,56
Cooperatividade Média (n)	<i>Stripped</i>	1,27	1,34
	IHP	1,44	2,20
Efeito Bohr	<i>Stripped</i>	0,32	0,24
	IHP	0,42	0,41

Resultado I) Hb Deer Lodge + Hb S

Composição do hemolisado total: Hb Deer Lodge = 54,8% (concomitante à HbA₂)
Hb S = 38,1%
Hb A₂ = 3,2%
Hb F = 5,1%

Neste caso há a associação de duas alterações: Hb Deer Lodge ($\beta 2 \text{ His} \rightarrow \text{Arg}$) e Hb S ($\beta 6 \text{ Glu} \rightarrow \text{Val}$). Apesar da curva de dissociação não demonstrar considerável alteração quanto à afinidade (Figura 36), cálculos do coeficiente de Hill (n) indicaram diminuição da cooperatividade quando da presença de IHP (Figura 37). Nota-se, portanto, que a afinidade global observada foi uma média resultante entre a afinidade proporcionada pela Hb S (detectada numa concentração de 38,1%, a qual, tem $p50$ igual à Hb nativa) e a afinidade aumentada proporcionada pela Hb Deer Lodge (54,8%). Da mesma maneira, o Efeito Bohr foi influenciado positivamente, tendendo à normalidade (Tabela 10).

j) Hb G-Siriraj ($\beta 7 \text{ Glu} \rightarrow \text{Lys}$)

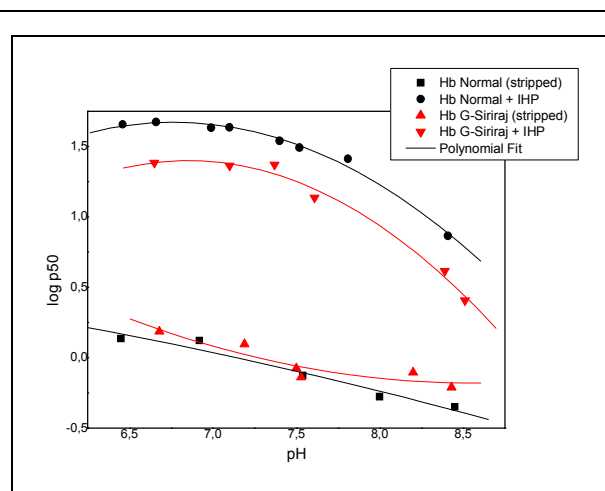


Figura 38. Variação da afinidade Hb-O₂ em função do pH (Efeito Bohr) – Hb G-Siriraj.

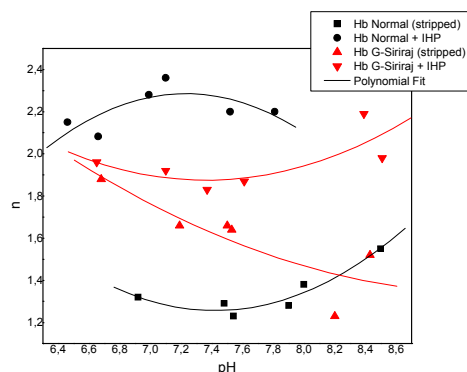


Figura 39. Variação de cooperatividade da ligação Hb-O₂ (coeficiente de Hill, n) em função do pH – Hb G-Siriraj.

Tabela 11. Resultados quantitativos de Afinidade, Cooperatividade e Efeito Bohr para a Hb G-Siriraj.

		Hb G-Siriraj	Hb normal
Afinidade – logp50 (pH 7,4)	<i>Stripped</i>	-0,04	-0,08
	IHP	1,29	1,56
Cooperatividade Média (n)	<i>Stripped</i>	1,60	1,34
	IHP	1,96	2,20
Efeito Bohr	<i>Stripped</i>	0,23	0,24
	IHP	0,53	0,41

Resultado J) Hb G-Siriraj

Composição do hemolisado total: *Hb G-Siriraj* = 25,9%
 Hb A₁ = 31,9%
 Hb A₂ = 5,3%
 Hb F = 0,7%

A caracterização funcional do hemolisado contendo Hb G-Siriraj ($\beta 7$ Glu $\rightarrow$ Lys) é inédita na literatura. Os experimentos indicaram que esta variante apresenta afinidade aumentada pelo O₂ somente quando na presença de IHP (Figura 38), com aumento do Efeito Bohr (Tabela 11) e pequena redução da cooperatividade (Figura 39). Entretanto, no estado *stripped*, a afinidade desta proteína pelo oxigênio não foi significativamente alterada, apesar de se observar uma tendência na diminuição deste evento em pHs extremos (Figura 38). Interessante notar que esta variante, no referido estado, apresentou cooperatividades bastante discrepantes, de acordo com o pH (Figura 39). Ou seja, em pHs mais ácidos comportou-se de modo muito cooperativo (acima dos valores normais encontrados), o que gradativamente se inverteu com o aumento do pH. Na média final, a cooperatividade desta proteína em seu estado purificado foi maior em relação à Hb A (Tabela 11).

k) Hb G-Siriraj ($\beta 7 \text{ Glu} \rightarrow \text{Lys}$) + Hb C ($\beta 6 \text{ Glu} \rightarrow \text{Lys}$)

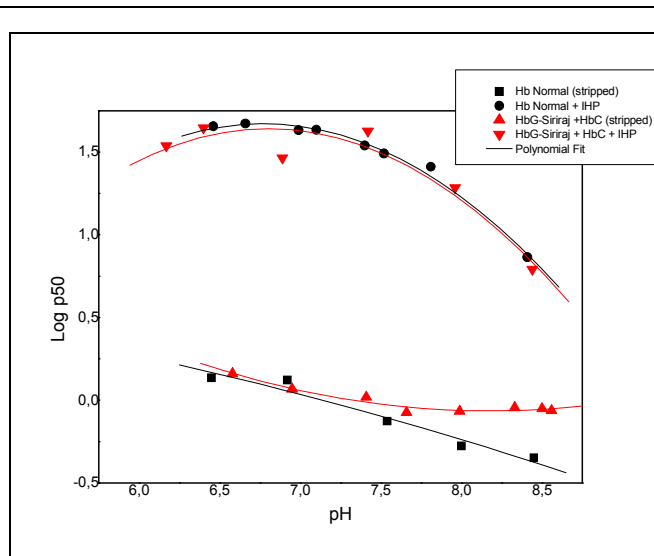


Figura 40. Variação da afinidade Hb-O₂ em função do pH
(Efeito Bohr) – Hb G-Siriraj + Hb C.

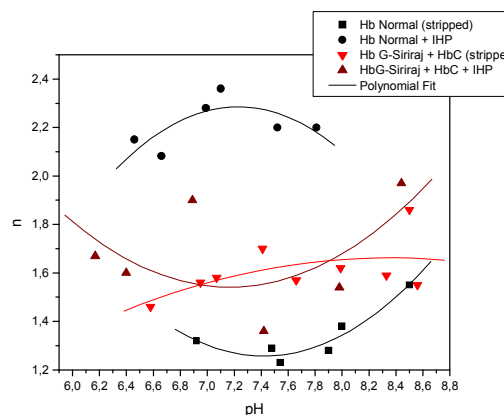


Figura 41. Variação de cooperatividade da
ligação Hb-O₂ (coeficiente de Hill, n) em
função do pH – Hb G-Siriraj + Hb C.

Tabela 12. Resultados quantitativos de Afinidade, Cooperatividade e Efeito Bohr para a Hb G-Siriraj + Hb C.

		Hb G-Siriraj + Hb C	Hb normal
Afinidade - logp50 (pH 7,4)	<i>Stripped</i>	0,04	-0,08
	IHP	1,53	1,56
Cooperatividade Média (n)	<i>Stripped</i>	1,59	1,34
	IHP	1,67	2,20
Efeito Bohr	<i>Stripped</i>	0,11	0,24
	IHP	0,33	0,41

Resultado K) Hb G-Siriraj + Hb C

Composição do hemolisado total: Hb G-Siriraj + Hb C = 91,5%
(concomitante para ambas as variantes de Hb)
Hb A₂ = 5,1%
Hb F = 0,5%

De nosso conhecimento, este é o primeiro caso de associação entre a Hb G-Siriraj ($\beta 7 \text{ Glu} \rightarrow \text{Lys}$) e a Hb C ($\beta 6 \text{ Glu} \rightarrow \text{Lys}$). A quantificação das cadeias anômalas foi de 10,58% - $\beta^{\text{G-Siriraj}}$ e 30,87% - β^{C} (Tabela 1). Os testes funcionais indicaram alteração, mas o a afinidade pelo oxigênio apresentada foi semelhante à Hb C, que se comporta com diminuição do efeito Bohr quando em estado *stripped* (Tabela 12) (ANTONINI e BRUNONI, 1971).

Observou-se que este perfil decorre de uma menor afinidade do hemolisado total pelo oxigênio quando em pHs mais alcalinos (Figura 40). Uma tendência à normalidade foi observada quando o IHP foi adicionado, tanto em relação à afinidade quanto em relação ao efeito Bohr, o que sugere a existência de interação entre as variantes, que parece ser positiva do ponto de vista funcional em relação aos fosfatos orgânicos. Em contrapartida, os valores de cooperatividade (n) desta associação, em estado *stripped*, se mostraram aumentados e, quando da adição de IHP, reduzidos (Figura 41; Tabela 12).

I) Hb M-Saskatoon ($\beta 63 \text{ His} \rightarrow \text{Tyr}$)

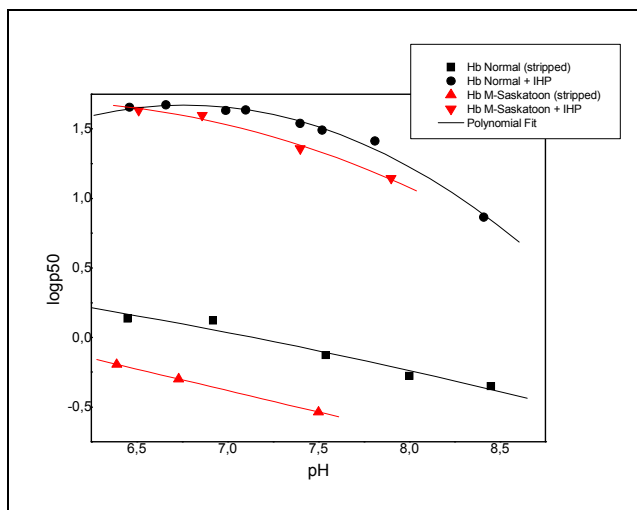


Figura 42. Variação da afinidade Hb-O₂ em função do pH
(Efeito Bohr) – Hb M-Saskatoon.

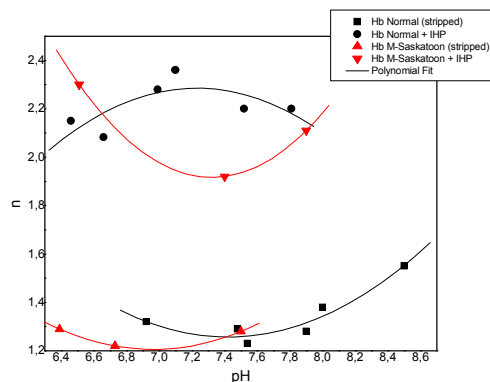


Figura 43. Variação de cooperatividade da
ligação Hb-O₂ (coeficiente de Hill, n) em função
do pH – Hb M-Saskatoon.

Tabela 13. Resultados quantitativos de Afinidade, Cooperatividade e Efeito Bohr para a Hb M-Saskatoon.

		Hb M-Saskatoon	Hb normal
Afinidade - logp50 (pH 7,4)	<i>Stripped</i>	-0,51	-0,08
	IHP	1,35	1,56
Cooperatividade Média (n)	<i>Stripped</i>	1,26	1,34
	IHP	2,11	2,20
Efeito Bohr	<i>Stripped</i>	0,31	0,24
	IHP	0,35	0,41

Resultado L) Hb M-Saskatoon

Composição do hemolisado total: $Hb \text{ M-Saskatoon} = 13,7\%$
 $Hb A_1 = 82,3\%$
 $Hb A_2 = 3,1\%$
 $Hb F = 0,9\%$

A Hb M-Saskatoon ($\beta 63$ His $\rightarrow$ Tyr) é decorrente da substituição da histidina distal (63) da cadeia beta por tirosina. É uma metahemoglobina (Hb M), pois sofre oxidação do ferro da porção heme, de Nox^{2+} para Nox^{3+} . Deste modo, fica impossibilitada de exercer, com eficácia, o transporte de oxigênio, o que, *in vivo*, resulta em cianose ao seu portador. Os testes *in vitro*, porém, demonstraram elevada afinidade pelo O_2 (Figura 42), possivelmente devido à dimerização da proteína quando exposta a estas condições (NISHIKURA et al., 1975). Em concordância com resultados prévios da literatura, a cooperatividade (Figura 43) e o Efeito Bohr podem ser considerados relativamente normais (Tabela 13) (NISHIKURA et al., 1975).

m) Hb Redondo ($\beta 92 \text{ His} \rightarrow \text{Asn}$)

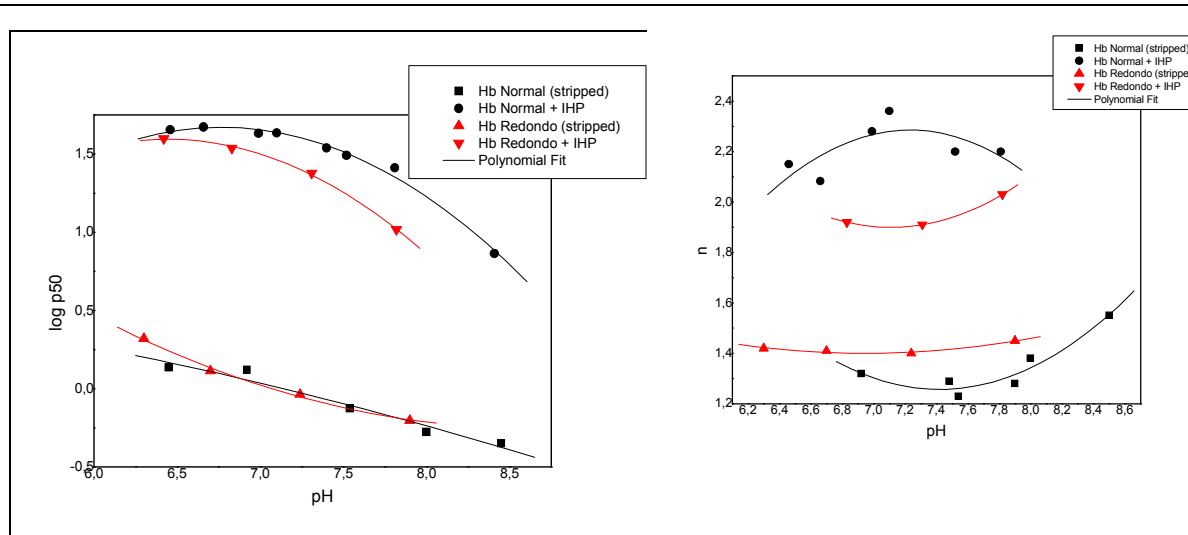


Figura 44. Variação da afinidade Hb-O₂ em função do pH
(Efeito Bohr) – Hb Redondo.

Figura 45. Variação de cooperatividade da
ligação Hb-O₂ (coeficiente de Hill, n) em função
do pH – Hb Redondo.

Tabela 14. Resultados quantitativos de Afinidade, Cooperatividade e Efeito Bohr para a Hb Redondo.

		Hb Redondo	Hb normal
Afinidade - logp50 (pH 7,4)	<i>Stripped</i>	-0,08	-0,08
	IHP	1,26	1,56
Cooperatividade Média (n)	<i>Stripped</i>	1,42	1,34
	IHP	1,95	2,20
Efeito Bohr	<i>Stripped</i>	0,33	0,24
	IHP	0,42	0,41

Resultado M) Hb Redondo

Composição do hemolisado total: Hb Redondo = 13%
Hb A₁ = 74,4%
Hb A₂ = 4,4%
Hb F = 8,2%

A Hb Redondo ($\beta 92 \text{ His} \rightarrow \text{Asn}$), apesar de instável e da pequena concentração de 13%, demonstrou redução na afinidade pelo oxigênio somente quando o IHP foi adicionado (Figura 44), o que também refletiu na diminuição da cooperatividade (Figura 45). Entretanto, o efeito Bohr se manteve normal (Tabela 14). Esta variante foi primeiramente isolada e caracterizada, do ponto de vista funcional, por Wacjman et al., em 1991, os quais observaram resultados compatíveis com aqueles por nós encontrados, mesmo na alta concentração de Hb F (8,2%) presente no hemolisado total.

n) Hb Köln ($\beta 98 \text{ Val} \rightarrow \text{Met}$)

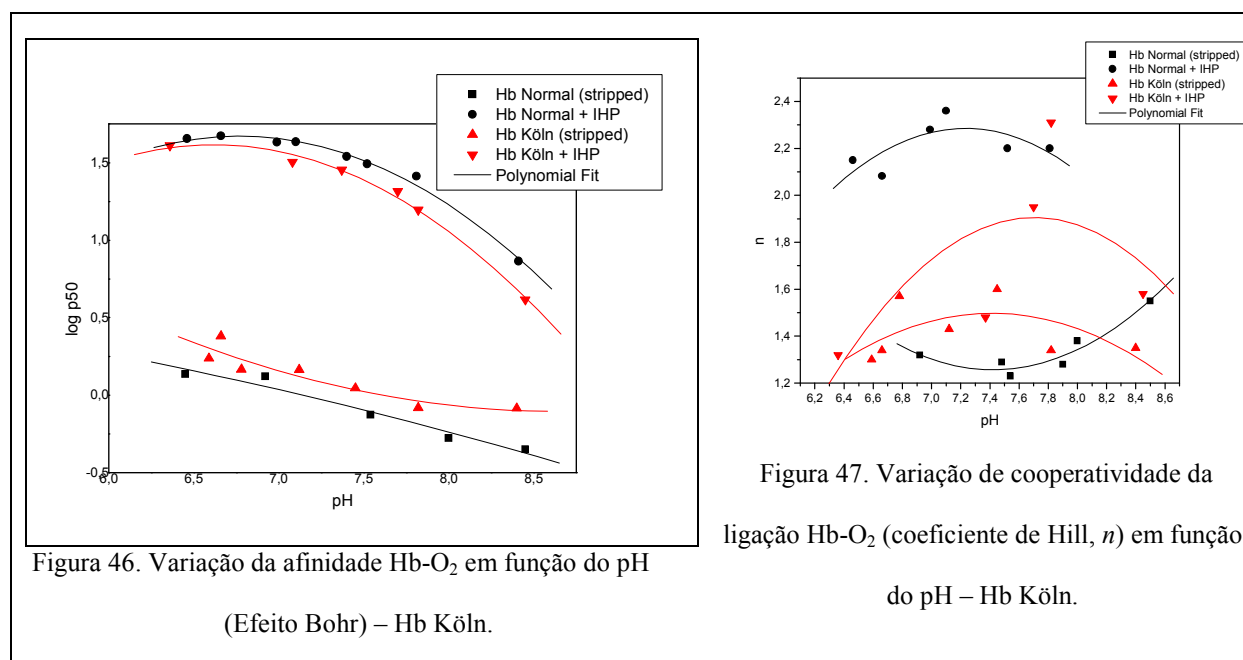


Tabela 15. Resultados quantitativos de Afinidade, Cooperatividade e Efeito Bohr para a Hb Köln.

		Hb Köln	Hb normal
Afinidade – logp50 (pH 7,4)	<i>Stripped</i>	0,05	-0,08
	IHP	1,44	1,56
Cooperatividade Média (n)	<i>Stripped</i>	1,38	1,34
	IHP	1,73	2,20

	Efeito Bohr	<i>Stripped</i>	0,18	0,24	
		IHP	0,48	0,41	

Resultado N) Hb Köln

Composição do hemolisado total: *Hb Köln = 9,1%*
 Hb A₁ = 85,9%
 HbA₂ = 3,7%
 Hb F = 1,3%

A Hb Köln ($\beta 98 \text{ Val} \rightarrow \text{Met}$) foi encontrada em portador proveniente do estado do Ceará, cuja amostra nos foi encaminhada através do HEMOCE (Hemocentro do Ceará). Este, de nosso conhecimento, é o primeiro caso desta variante na população do Nordeste brasileiro.

Nossos resultados, com o hemolisado purificado, demonstraram uma pequena redução da afinidade pelo O_2 (Figura 46), diferentemente dos dados disponíveis na literatura, que apontavam afinidade aumentada, principalmente quando da adição de IHP (IMAI et al., 2001). Os valores de cooperatividade, no entanto, foram concordantes, os quais demonstraram estar bastante alterados (Tabela 15), principalmente após a adição de IHP (Figura 47). Os valores referentes ao Efeito Bohr foram discretamente reduzidos devido à menor afinidade da proteína pelo ligante O_2 quando em pH em torno de 8,5, o que demonstra a influência do pH na efetiva ligação Hb- O_2 (Tabela 15). Há de se ressaltar, no entanto, a baixa concentração da variante no hemolisado aqui estudado, de apenas 9,1%, o que pode ter influenciado sobremaneira os resultados encontrados.

o) Hb Coimbra ($\beta 99 \text{ Asp} \rightarrow \text{Glu}$)

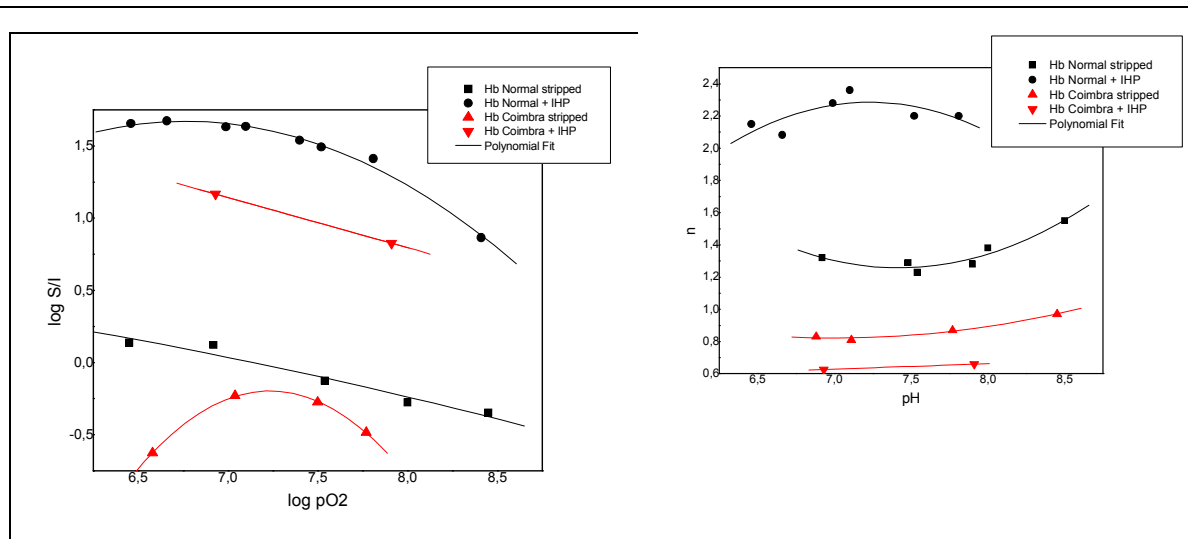


Figura 48. Variação da afinidade Hb-O₂ em função do pH

(Efeito Bohr) – Hb Coimbra.

Figura 49. Variação de cooperatividade da ligação Hb-O₂ (coeficiente de Hill, *n*) em função do pH – Hb Coimbra.

Tabela 16. Resultados quantitativos de Afinidade, Cooperatividade e Efeito Bohr para a Hb Coimbra.

		Hb Coimbra	Hb normal
Afinidade - logp50 (pH 7,4)	<i>Stripped</i>	-0,23	-0,08
	IHP	1,00	1,56
Cooperatividade Média (<i>n</i>)	<i>Stripped</i>	0,87	1,34
	IHP	0,64	2,20
Efeito Bohr	<i>Stripped</i>	0,12	0,24
	IHP	0,35	0,41

Resultado O) Hb Coimbra

Composição do hemolisado total: Hb Coimbra = % Não determinada
Hb A₂ = 3,8%
Hb F = 0,8%

Em acordo com os resultados disponíveis na literatura, a Hb Coimbra ($\beta 99 \text{ Asp} \rightarrow \text{Glu}$) apresentou afinidade aumentada pelo oxigênio na presença e na ausência de IHP (Figura 48; Tabela 16). A substituição de aminoácido aqui ocorre em posição de contato entre as cadeias alfa e beta ($\beta 2\alpha 2$), o que reduz drasticamente a cooperatividade, de modo a anulá-la completamente quando o hemolisado está em seu estado *stripped* (Figura 49; Tabela 16).

p) Hb Dhonburi ($\beta 126 \text{ Val} \rightarrow \text{Gly}$)

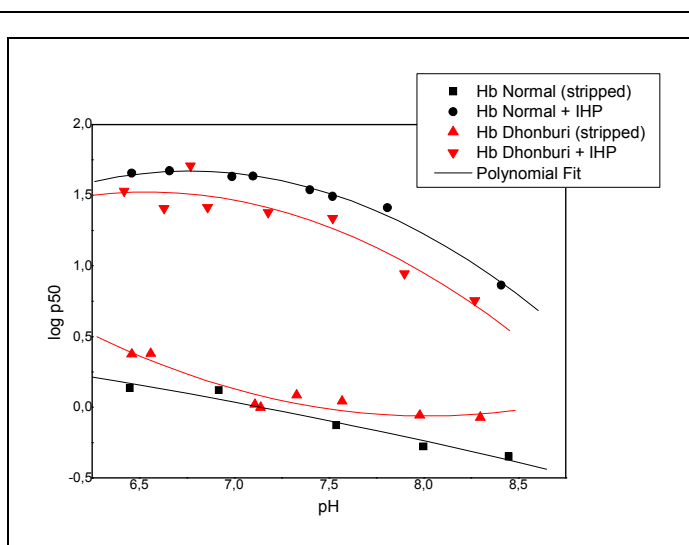


Figura 50. Variação da afinidade Hb-O₂ em função do pH
(Efeito Bohr) – Hb Dhonburi.

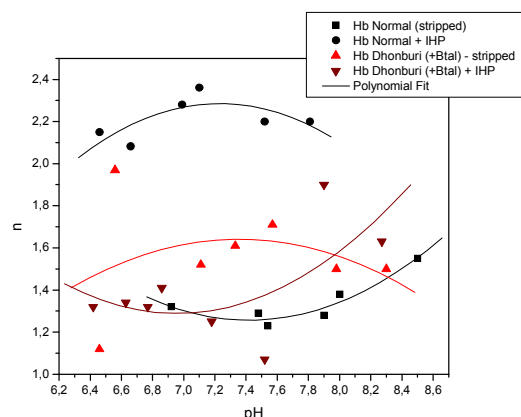


Figura 51. Variação de cooperatividade da ligação
Hb-O₂ (coeficiente de Hill, *n*) em função do pH – Hb
Dhonburi.

Tabela 17. Resultados quantitativos de Afinidade, Cooperatividade e Efeito Bohr para a Hb Dhonburi.

		Hb Dhonburi (+ β^{tal})	Hb normal
Afinidade - logp50 (pH 7,4)	<i>Stripped</i>	0,01	-0,08
	IHP	1,32	1,56
Cooperatividade Média (n)	<i>Stripped</i>	1,56	1,34
	IHP	1,41	2,20
Efeito Bohr	<i>Stripped</i>	0,24	0,24
	IHP	0,42	0,41

Resultado P) Hb Dhonburi

Composição do hemolisado total: Hb Dhonburi = % Não determinada
HbA₂ = 7,3%
Hb F = 7,9%

É inédita a caracterização funcional do hemolisado contendo Hb Dhonburi (β^{126} Val→ Gly), a qual demonstrou considerável alteração nos parâmetros de ligação ao O₂. O portador estudado apresentava, concomitantemente, heterozigose da talassemia β^0 , o que possibilitou o estudo desta variante sem qualquer interferência da fração normal.

Enquanto esta proteína se comportou com afinidade reduzida pelo oxigênio em seu estado *stripped*, de modo ainda mais acentuado em pHs extremos (ácidos e alcalinos), apresentou maior afinidade pelo O₂ quando adicionado IHP (Figura 50). Entretanto, o efeito Bohr calculado não demonstrou qualquer alteração (Tabela 17). A cooperatividade, por sua vez, apresentou-se consideravelmente diminuída somente quando adicionado IHP, estando ligeiramente aumentada nos pHs mais alcalinos na ausência deste co-fator (Figura 51). Há, no entanto, de se considerar que a presença de Hb F, compensatória à talassemia beta, pode influenciar no aumento da afinidade da proteína variante pelo oxigênio, principalmente quando da adição de IHP. No entanto, é preciso lembrar que o hemolisado total apresentou

afinidade diminuída no estado *stripped*, por conta da possível afinidade diminuída da Hb Dhonburi.

5.3. Resumo dos Resultados dos Estudos Funcionais

Os resultados dos estudos funcionais estão sumarizados na Tabela 16:

Tabela 18. Resultados dos Testes Funcionais das Variantes Estudadas. As siglas seguintes apresentam as definições: ↑ = aumentado (a); ↓ = diminuído (a).

Hemoglobina Anômala	Afinidade	Cooperatividade Média (<i>n</i>)	Efeito Bohr
Variantes NOVAS			
Hb Boa Esperança (α16 Lys→Thr)	<i>Stripped</i> : ↓ afinidade IHP: ↑ afinidade (pH >7,5)	<i>Stripped</i> : <i>n</i> normal IHP: <i>n</i> normal	<i>Stripped</i> : leve ↑ Efeito Bohr IHP: leve ↓ Efeito Bohr
Hb Itapira (α30 Glu→Val)	<i>Stripped</i> : afinidade normal IHP: afinidade normal	<i>Stripped</i> : leve ↑ <i>n</i> IHP: leve ↓ <i>n</i>	<i>Stripped</i> : Efeito Bohr normal IHP: ↑ Efeito Bohr
Hb Bom Jesus da Lapa (α30 Glu→Ala)	<i>Stripped</i> : afinidade normal IHP: afinidade normal	<i>Stripped</i> : leve ↑ <i>n</i> IHP: leve ↓ <i>n</i>	<i>Stripped</i> : Efeito Bohr normal IHP: ↑ Efeito Bohr
Hb Olinda [β22 (b4)–25 (b7)]	<i>Stripped</i> : ↓ afinidade IHP: ↑ afinidade (pH alcalinos)	<i>Stripped</i> : <i>n</i> normal IHP: <i>n</i> normal	<i>Stripped</i> : Efeito Bohr normal IHP: breve ↑ Efeito Bohr
Hb Caruaru (β122 Phe→Ser)	<i>Stripped</i> : ↑ afinidade IHP: ↑ afinidade	<i>Stripped</i> : ↓ <i>n</i> (não cooperatividade <i>heme-heme</i>) IHP: <i>n</i> normal	<i>Stripped</i> : Efeito Bohr normal IHP: Efeito Bohr normal
Hb S-São Paulo (β6 Glu→Val ; β65 Lys→Glu)	<i>Stripped</i> : ↓ afinidade IHP: leve ↑ afinidade (pH >7,5)	<i>Stripped</i> : <i>n</i> normal IHP: ↓ <i>n</i>	<i>Stripped</i> : leve ↓ Efeito Bohr IHP: ↑ Efeito Bohr
Variantes RARAS			
Hb Iwata (α87 His→ Arg)	<i>Stripped</i> : ↓ afinidade (principalmente em pHs ≥7,75) IHP: breve ↑ afinidade (pH >8,0)	<i>Stripped</i> : ↑ <i>n</i> (invariável com pH) IHP: <i>n</i> normal	<i>Stripped</i> : ↓ Efeito Bohr IHP: ↑ Efeito Bohr
Hb Sunshine Seth	<i>Stripped</i> : leve ↓ afinidade	<i>Stripped</i> : <i>n</i> normal	<i>Stripped</i> : Efeito Bohr

(α 94 Asp→His)	IHP: leve ↑ afinidade	IHP: n normal	normal IHP: ↑ Efeito Bohr
Hb Deer Lodge (β 2 His→ Arg)	<i>Stripped</i> : normal IHP: ↑ afinidade	<i>Stripped</i> : n normal IHP: ↓ n	<i>Stripped</i> : ↓ do efeito Bohr IHP: ↓ do efeito Bohr
Hb Deer Lodge + Hb S (β 2 His→ Arg) + (β 6 Glu→ Val)	<i>Stripped</i> : afinidade normal IHP: afinidade normal	<i>Stripped</i> : n normal IHP: ↓ n	<i>Stripped</i> : Efeito Bohr normal IHP: Efeito Bohr normal
Hb G-Siriraj (β 7 Glu→ Lys)	<i>Stripped</i> : ↑ afinidade IHP: afinidade normal	<i>Stripped</i> : ↑ n IHP: leve ↓ n	<i>Stripped</i> : Efeito Bohr normal IHP: Efeito Bohr normal
Hb G-Siriraj + Hb C (β 7 Glu→ Lys) + (β 6 Glu→ Lis)	<i>Stripped</i> : ↓ afinidade ($\text{pH} \geq 7,4$, principalmente $\text{pH} > 8,0$) IHP: afinidade normal	<i>Stripped</i> : ↑ n IHP: ↓ n	<i>Stripped</i> : ↓ Efeito Bohr IHP: Efeito Bohr normal
Hb M-Saskatoon (β 63 His→ Tyr)	<i>Stripped</i> : ↑ afinidade IHP: leve ↑ afinidade	<i>Stripped</i> : n normal IHP: n normal	<i>Stripped</i> : leve ↑ Efeito Bohr IHP: leve ↓ Efeito Bohr
Hb Redondo (β 92 His→ Asn)	<i>Stripped</i> : afinidade normal IHP: ↓ afinidade	<i>Stripped</i> : n normal IHP: leve ↓ n	<i>Stripped</i> : Efeito Bohr normal IHP: Efeito Bohr normal
Hb Köln (β 98 Val→ Met)	<i>Stripped</i> : leve ↓ afinidade IHP: leve ↑ da afinidade	<i>Stripped</i> : n normal IHP: ↓ n	<i>Stripped</i> : leve ↓ Efeito Bohr IHP: leve ↑ Efeito Bohr
Hb Coimbra (β 99 Asp→ Glu)	<i>Stripped</i> : considerável ↑afinidade IHP: considerável ↑ afinidade	<i>Stripped</i> : Não cooperativo IHP: Não cooperativo	<i>Stripped</i> : ↓ efeito Bohr IHP: leve ↓ efeito Bohr
Hb Dhonburi (β 126 Val→ Gly)	<i>Stripped</i> : leve ↓ afinidade (principalmente pHs extremos) IHP: ↑ afinidade	<i>Stripped</i> : discreta ↓ n IHP: ↓ n	<i>Stripped</i> : normal IHP: normal

5.4. Dinâmica Molecular

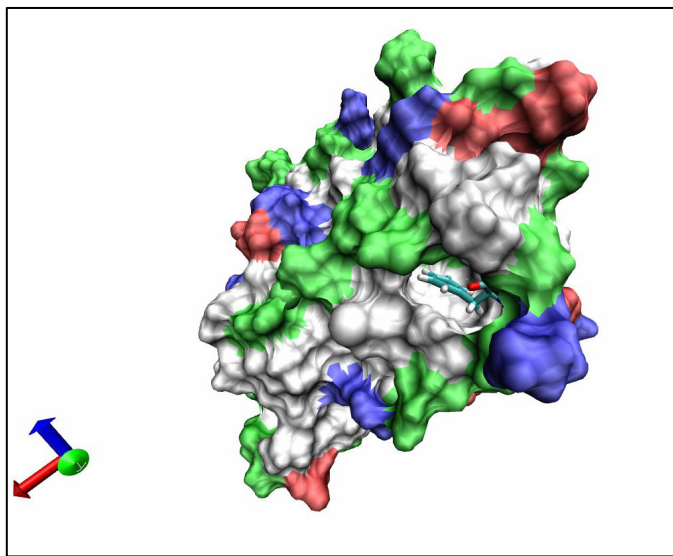
A Dinâmica Molecular das variantes Hb Caruaru e Hb S-São Paulo no estado oxigenado, realizadas em caixa de simulação de $100\text{\AA}^3$, nas condições de temperatura, moléculas de água e íons supra citadas, resultou nos seguintes dados:

a) Hb Caruaru ($\beta 122 \text{ Phe} \rightarrow \text{Ser}$)

A substituição da fenilalanina por serina na posição 122 da cadeia beta, efetuada na estrutura nativa 1GZX, depositada no *Protein Data Bank*, promoveu a troca de resíduo volumoso de cadeia lateral hidrofóbica por hidrofílica (cujo resíduo tem menor volume), que levou à instabilidade molecular, nas condições supra citadas (Figura 52). Isso porque há desvio de ligação da hidroxila deste resíduo dentro da cavidade, por conta da quebra de prováveis ligações de hidrogênio e interações eletrostáticas entre $\beta \text{Ser}122$ e $\alpha \text{Arg}31$, $\beta \text{Val}111$ e $\beta \text{Ala}115$.

Análise de solvatação não demonstrou indícios da entrada de água em decorrência da substituição, o que levaria a um colapso da cavidade hidrofóbica. A $\alpha \text{Arg}31$ parece apresentar importante papel na interação com moléculas de água, impedindo a entrada de tais moléculas na cavidade. Entretanto, para a observação de tal evento, maior tempo de simulação será necessário, de modo a promover a diminuição da escala de tempo provável para a ocorrência do evento.

Estrutura oxi nativa ($\beta 122$ = fenilalanina)



Estrutura oxi nativa ($\beta 122$ = serina)

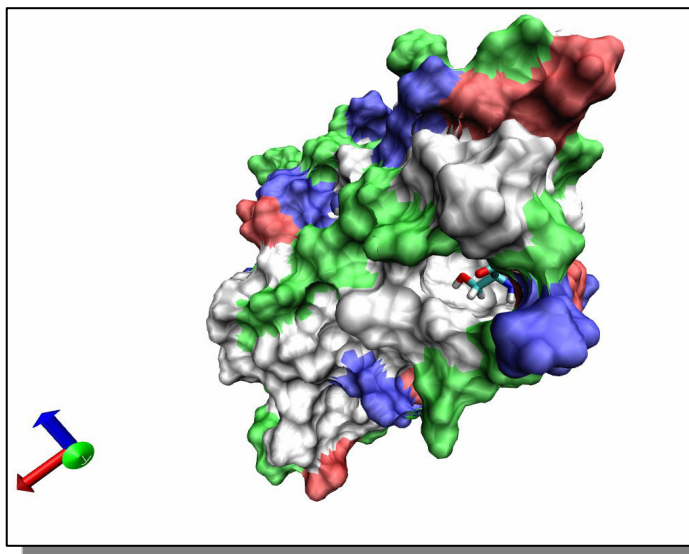


Figura 52. Resultados iniciais de Dinâmica Molecular da Hb Caruaru – *surface view* estrutura 1GZX do *Protein Data Bank*. Regiões básicas estão representadas em azul, ácidas em vermelho, enquanto regiões polares estão em verde e não-polares em branco.

b) Hb S-São Paulo ($\beta 6 \text{ Glu} \rightarrow \text{Val}$; $\beta 65 \text{ Lys} \rightarrow \text{Glu}$)

As substituições do ácido glutâmico por valina na posição 6 da cadeia beta e da lisina por ácido glutâmico na posição 65 da mesma globina resultaram no deslocamento da hélice E da cadeia beta (Figura 53 e 58). Isso porque a interação entre a $\beta 65 \text{ Lys}$ (hélice E), resíduo nativo, e $\beta 21 \text{ Asp}$ (hélice B) é perdida quando da substituição por $\beta 65 \text{ Glu}$. Por conseguinte há o deslocamento de hélices e movimentação da $\beta 62 \text{ His}$ (histidina distal), o que dificultaria a entrada do ligante oxigênio no *heme pocket*. Entretanto, seriam necessários estudos de dinâmica molecular, no qual haja a simulação da entrada de oxigênio no sistema para comprovação deste processo.

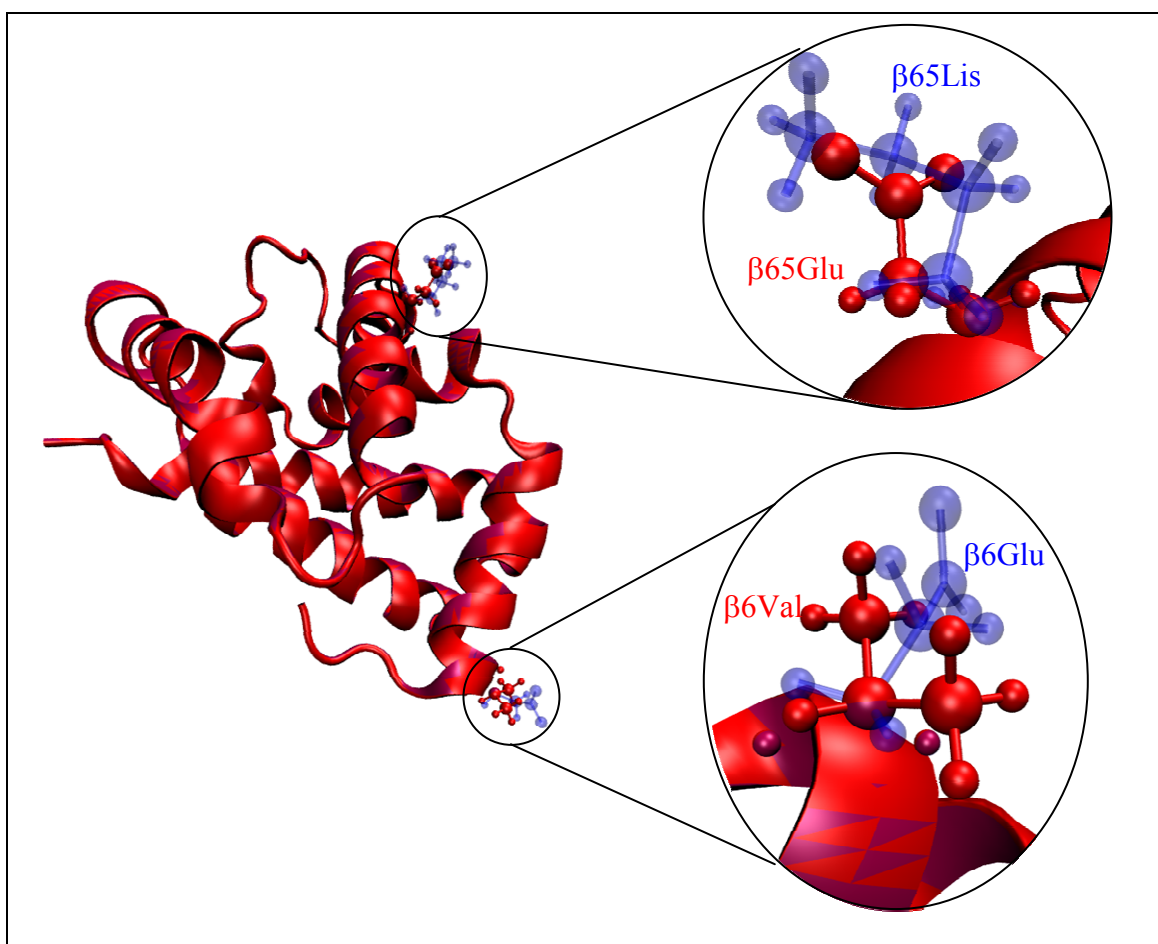


Figura 53. Resultado das substituições (em vermelho) dos resíduos nativos (em azul) da estrutura 1GZX do *Protein Data Bank* (Hb S-São Paulo).

DISCUSSÃO

Através da visualização das estruturas nativas 2DN1 (oxi-Hb) e 2DN2 (desoxi-Hb) baixadas do *Protein Data Bank* foi possível analisar a importância dos resíduos substituídos, para melhor compreensão dos resultados funcionais alterados das hemoglobinas mutantes. Com exceção das Hb Caruaru e Hb S-São Paulo, para as quais foram realizados experimentos de dinâmica molecular, as demais Figuras foram obtidas através do programa de visualização *Visual Molecular Dynamics* – VMD.

6.1. Variantes Novas

6.1.1. Variantes de Globina Alfa

a) Hb Boa Esperança ($\alpha 16$ (A14) Lys $\rightarrow$ Thr)

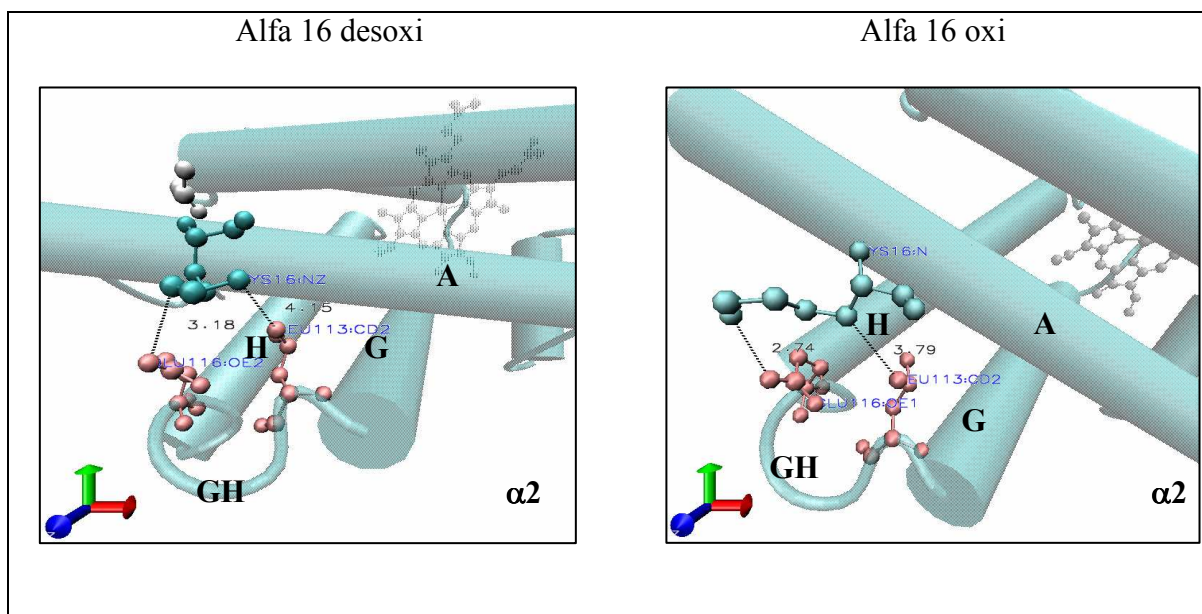


Figura 54. Resíduo 16 da cadeia alfa - Estrutura nativa (2DN2 e 2DN1).

A Hb Boa Esperança ($\alpha 16$ (A14) Lys $\rightarrow$ Thr) foi detectada em indivíduo assintomático, candidato à doação sanguínea. Entretanto, estudos de ligação O₂-Hb

indicaram alteração funcional desta variante, que apresentou afinidade diminuída pelo oxigênio quando em seu estado purificado e comportamento inverso quando adicionado o fosfato orgânico.

Através da visualização da hemoglobina normal pelo programa VMD verificou-se que o aminoácido 16 da cadeia alfa, lisina (um resíduo polar básico), localizado ao final da hélice A, apresenta interações com aminoácidos da porção GH da mesma cadeia alfa da hemoglobina. A interação mais importante entre este resíduo e a porção inter-hélice se dá com o ácido glutâmico 116 (presente na referida hélice GH), através de ponte de hidrogênio, observada no estado oxigenado da proteína (Figura 54). Com a substituição deste resíduo por uma treonina (aminoácido polar neutro) há, possivelmente, perda desta interação, uma vez que, além de neutro, este resíduo tem tamanho menor em relação à lisina, o que possivelmente diminui a interação entre os aminoácidos destas hélices distintas. As conseqüências dessa perda para a estrutura e função da proteína ainda não são conhecidas. Através destes resultados supõe-se que haja maior rigidez estrutural, de forma a causar uma interferência indireta na ligação com o oxigênio, devido à alteração conformacional da hélice A, com conseqüências nas demais subunidades.

Assim, não somente a ligação do ferro do *heme pocket* com o oxigênio seria prejudicada, como também haveria, num possível efeito cascata, alteração na interação com fosfato orgânico - o que resultaria numa falsa afinidade aumentada pelo O₂ quando adicionado IHP, conforme observado nos resultados. Este fato também poderia explicar a cooperatividade diminuída, principalmente quando da adição de IHP. Serão necessários estudos de dinâmica molecular a partir da estrutura nativa alterada, para se alcançar uma melhor compreensão sobre a importância da interação entre os resíduos 16 e 116 da cadeia alfa na função final da hemoglobina.

b) Hb Itapira ($\alpha 30$ (B11) Glu→Val) e Hb Bom Jesus da Lapa ($\alpha 30$ Glu→Ala)

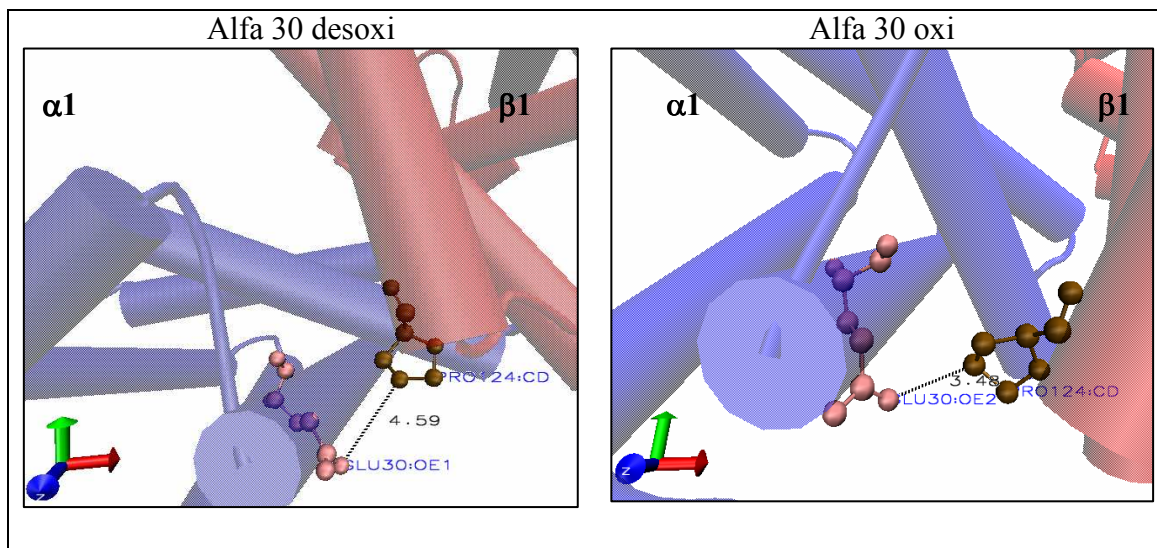


Figura 55. Resíduo 30 da cadeia alfa - Estrutura nativa (2DN2 e 2DN1).

A Hb Itapira ($\alpha 30$ (B11) Glu→Val) e Hb Bom Jesus da Lapa ($\alpha 30$ Glu→Ala) são decorrentes de substituições do ácido glutâmico na posição 30 (11º aminoácido da hélice B) da cadeia alfa. Seus portadores são clinicamente assintomáticos, e os estudos funcionais destas variantes nas porcentagens encontradas foram normais, a despeito da cooperatividade entre as globinas ser ligeiramente aumentada no estado *stripped* e diminuída com adição de IHP.

Teoricamente estas variantes deveriam apresentar alguma alteração funcional significativa, pois a posição 30 da cadeia alfa é um ponto de interface $\alpha 1\beta 1$, o que poderia conferir certa instabilidade à molécula (Figura 54). Entretanto, experimentalmente, os testes foram normais, possivelmente devido às respectivas proporções dessas variantes em relação

à hemoglobina total nos hemolisados estudados, e à possível estabilização da interface $\alpha 1\beta 1$ por outros resíduos.

O resíduo nesta posição, ácido glutâmico, está em região com presença de algumas moléculas de água. Entretanto, as interações que ocorrem entre este resíduo e o aminoácido da cadeia beta (principalmente a Prolina 124 da hélice H) não são de primordial importância, inclusive porque a distância entre eles não representa ser essencialmente significativa. Nas variantes investigadas, ambos os resíduos que substituíram o ácido glutâmico (valina e alanina) são neutros. Pela estrutura e características químicas destes aminoácidos, não há alteração extremamente importante a ponto de realmente se observar alteração funcional extrema. Há de se salientar, no entanto, que a cooperatividade parece ser de certo modo influenciada por tais substituições.

Duas outras variantes com substituição do ácido glutâmico nesta mesma posição já foram descritas: Hb G-Honolulu (Glu→Gln) (BLACKWELL et al., 1972) e Hb O-Padova (Glu→Lis) (VETTORE et al., 1974), cujos portadores são também assintomáticos. A última delas, a Hb O-Padova, também foi caracterizada funcionalmente e, assim como as variantes Itapira e Bom Jesus da Lapa, apresentou resultados normais.

6.1.2.Variantes de Globina Beta

c) Hb Olinda [β 22 (B4) –25 (B7)]

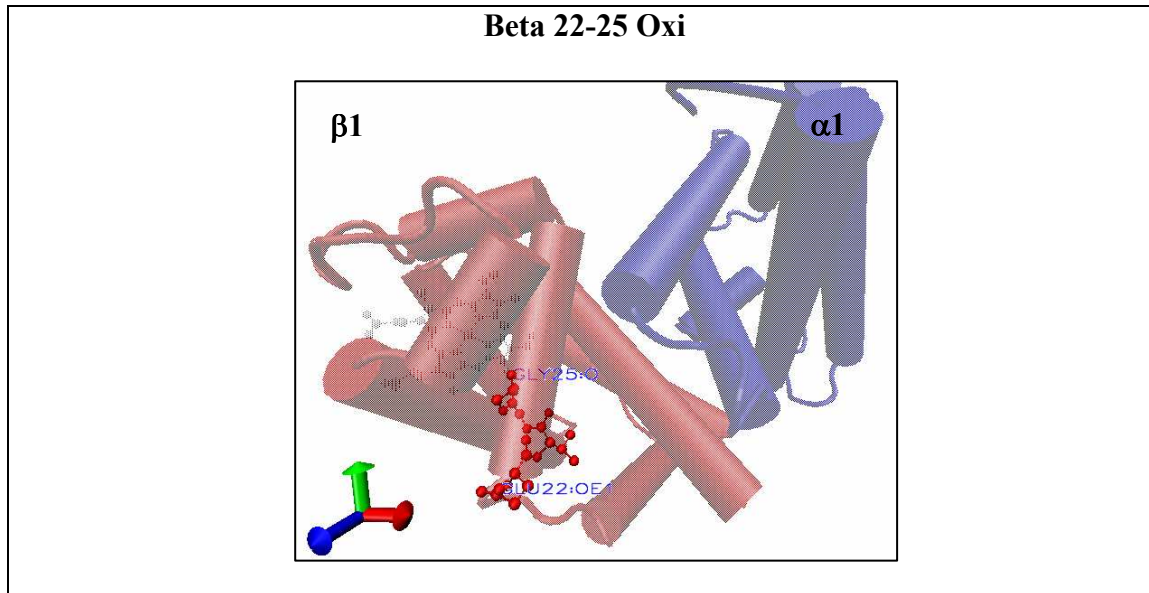


Figura 56. Resíduos 22 ao 25 (em evidência) da cadeia beta (perdidos) - Estrutura nativa (2DN1).

A Hb Olinda é uma variante bastante instável devido à perda de quatro aminoácidos (-Glu-Val-Gly-Gly) nas posições 22 a 25 da cadeia beta, presentes no início da hélice B (Figura 56). Esta proteína se comporta de maneiras distintas quando há adição de efetor alostérico (IHP) e na ausência dele (estado *stripped*), apresentando discreta diminuição da afinidade pelo oxigênio quando de seu estado *stripped*, e aumento nos pHs mais alcalinos quando adicionado IHP. Apesar da instabilidade, sua cooperatividade foi normal quando de seu estado isento de IHP. Ao adicionar esta substância, a variante apresentou menor cooperatividade em pHs mais ácidos e maior em pHs mais alcalinos. Pouco se pode discutir, porém, a respeito desta variante, já que se trata de uma proteína truncada. Assim,

seriam necessários estudos estruturais bastante detalhados para maior compreensão da falta das eventuais interações químicas formadas pelos resíduos subtraídos.

A simples observação da estrutura nativa 2DN1 - oxiHb (Figura 56), através do programa VMD, nos facultou perceber que tais resíduos não interagem substancialmente com as demais globinas, e sim com outras hélices desta subunidade, a exemplo do aminoácido 25 - Glicina, que está voltado para a região onde o *heme pocket* está localizado.

d) Hb Caruaru ($\beta 122$ (GH5) Phe→Ser)

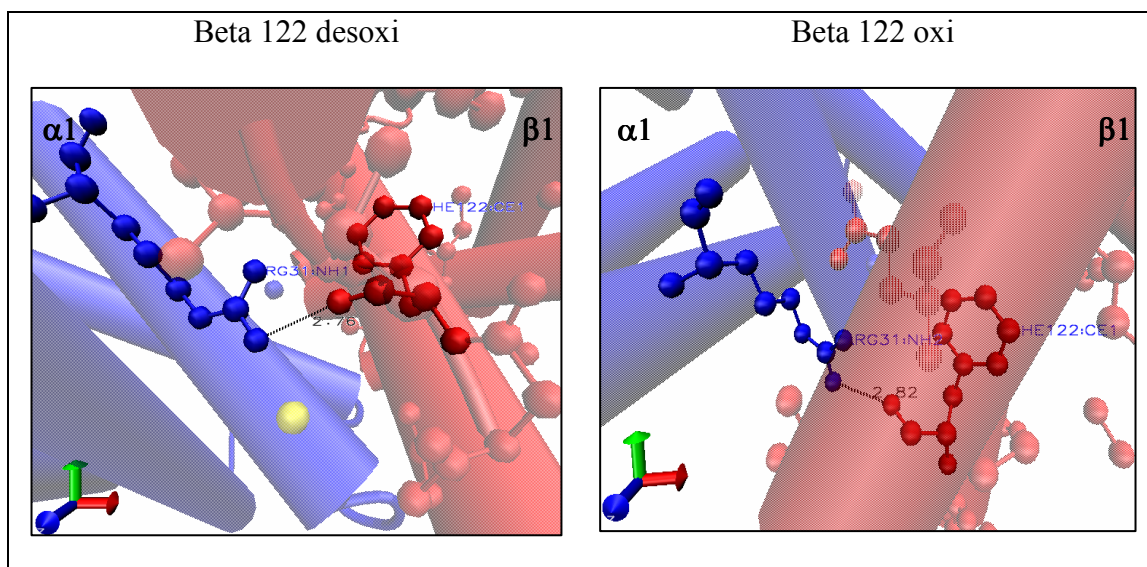


Figura 57. Resíduo 122 da cadeia beta - Estrutura nativa (2DN2 e 2DN1).

A Hb Caruaru ($\beta 122$ (GH5) Phe→Ser) é resultado da substituição de fenilalanina por serina na posição 122 (inter-hélice GH) da cadeia beta, numa região de interface $\alpha 1\beta 1$. De acordo com Nagel (2001), alterações nesta localidade favorecem o estado R, resultando em afinidade aumentada pelo O_2 , conforme observado nos testes funcionais. É preciso, no entanto, considerar também que o resíduo da proteína normal (Figura 57) é apolar e, além de interagir com aminoácido da cadeia alfa (arginina 31- hélice B), faz intensas interações com muitos outros aminoácidos apolares da própria cadeia beta, formando um importante bolsão hidrofóbico.

Estudos iniciais de Dinâmica Molecular (*Molecular Dynamics*-MD) feitos com esta variante no estado oxigenado (a partir da estrutura 1GZX depositada no *Protein Data Bank*), promovendo-se a substituição da fenilalanina por serina neste bolsão hidrofóbico (Figura 52), indicaram desestabilização da cadeia, o que pode promover instabilidade do tetrâmero, conforme observado nos testes *in vitro* (Tabela 1).

Apesar de serem resultados parciais, é possível se considerar esta região como um ponto crítico, principalmente quando houver troca da fenilalanina por um resíduo que não seja hidrofóbico, como é o caso da serina. Mas ainda é preciso maior tempo de dinâmica molecular para buscar-se compreender se esta variante tem realmente maior estabilidade no estado R e por isso apresenta afinidade aumentada, ou se ela pode, devido à sua instabilidade, chegar até mesmo a dimerizar-se, e, em decorrência do fenômenos de desestabilização, ter maior afinidade pelo O₂, bem como não apresentar nenhuma cooperatividade, conforme observado experimentalmente com a Hb no estado *stripped*.

e) Hb S-São Paulo ($\beta 6$ (A3) Glu→Val ; $\beta 65$ (E9) Lys→Glu)

Esta variante é composta por duas substituições na mesma cadeia beta (Glu→Val na posição 6 - referente à HbS, e Lys→Glu no 65º resíduo). Combinadas, conferem função alterada à proteína, com a diminuição da afinidade desta pelo oxigênio quando de seu estado *stripped* (Figura 28).

A desoxi-Hb S, em homozigose (SS), promove o evento de falcização das hemácias em decorrência de sua capacidade de polimerização. Isso ocorre porque o resíduo da posição 6 da cadeia beta (ácido glutâmico) é polar e tem seu grupamento R voltado à porção externa da proteína. Com sua substituição pelo aminoácido valina, um resíduo apolar, o grupamento R deste aminoácido é também exposto e, devido ao seu caráter de hidrofobicidade, promove a aproximação entre os tetrâmeros na tentativa de buscar um ambiente livre de íons, ou seja, mais apolar. Deste modo, ocorre a polimerização das proteínas, provocando a falcização das hemácias (Figura 58). Este evento, no entanto, não ocorre de modo significativo quando a Hb S encontra-se em heterozigose (AS), pelo efeito diluatório exercido pelas moléculas de Hb A, sempre em maior concentração do que a Hb anômala (ANTONINI e BRUNONI, 1971; HOFFBRAND et al., 2000; STUART e NAGEL, 2004).

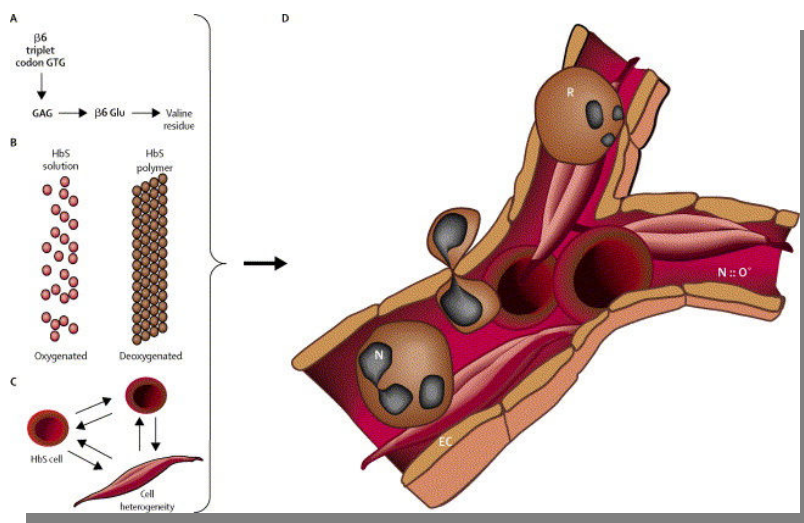


Figura 58. Processo de Polimerização da Hb S → Falcização das hemácias → Vasocclusão (STUART e NAGEL, 2004).

Além da substituição na posição 6, a Hb S-São Paulo apresenta também a troca de lisina por ácido glutâmico na 65ª posição da cadeia beta. Estudos iniciais de MD, nos quais se promoveu a substituição dos resíduos nativos pelos encontrados nessa variante, na forma oxigenada (a partir da estrutura 1GZX, depositada no *Protein Data Bank*), indicaram que a lisina da posição 65 (E9) tem importante papel na estabilidade da ligação com O₂. Com a substituição deste resíduo polar básico pelo ácido glutâmico (polar ácido), tem-se a perda da interação entre o aminoácido desta posição e o ácido aspártico 21 da mesma cadeia (hélice B- resíduo 3). Assim, diferentemente da estrutura nativa, além da perda desta interação há uma repulsão entre estes resíduos (ambos ácidos), o que poderia causar o deslocamento das hélices da cadeia β. Especial importância deve ser conferida ao deslocamento da própria hélice E, na qual se encontra o resíduo substituído, pois nela também está a histidina distal (E7), conforme Figura 59. Esta, por sua vez, é responsável pela estabilidade do O₂ no *heme pocket*. Assim, se deslocada, não seria capaz de interagir com o grupamento *heme*, inviabilizando, possivelmente, a estabilidade da hemoglobina no seu estado R- de ligação com O₂.

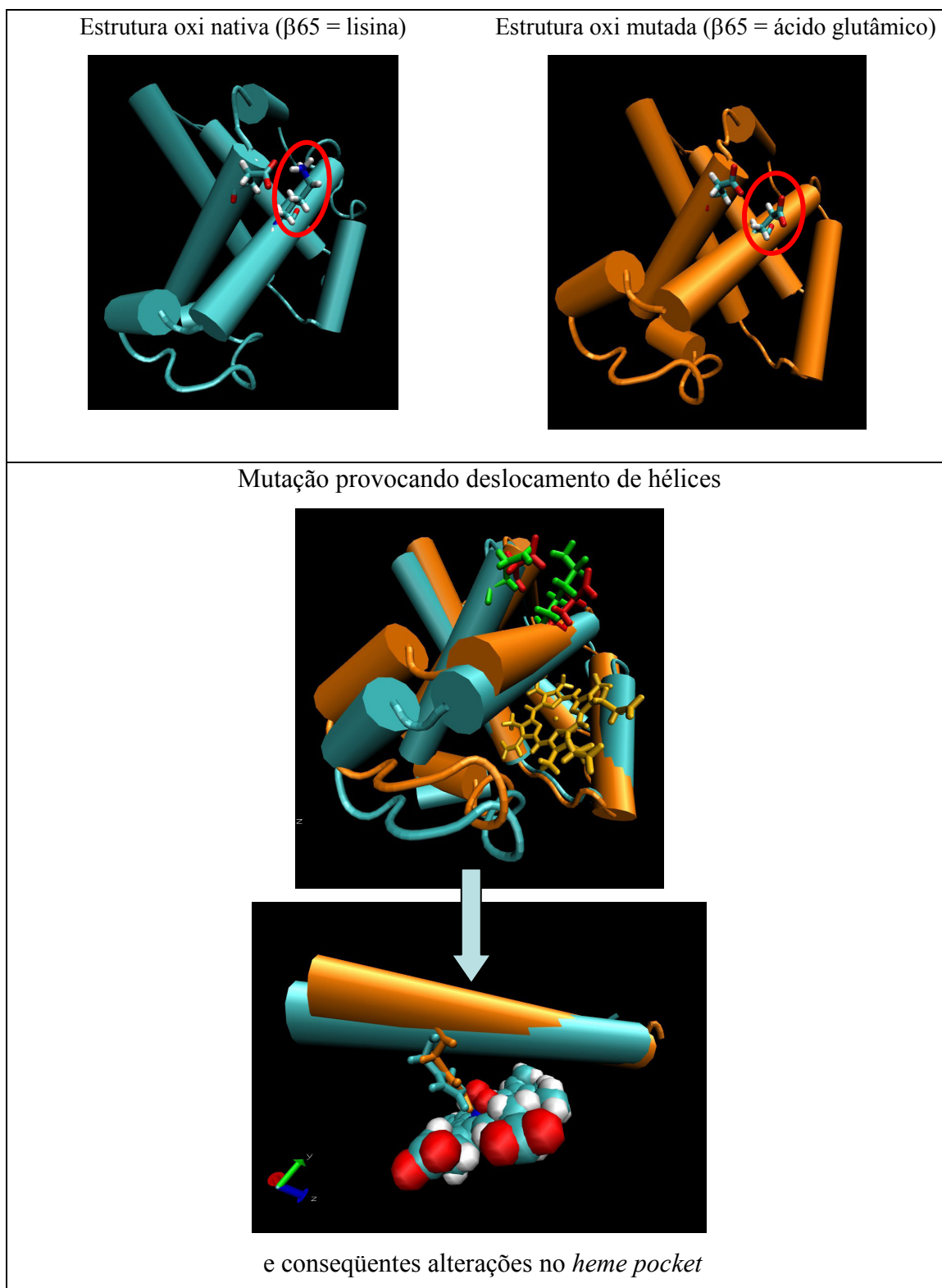


Figura 59. Resultados de Dinâmica Molecular da Hb S-São Paulo no qual foi feita a substituição dos resíduos, ocasionando o deslocamento das hélices da beta globina. Neste

experimento foram alinhados os *hemes* antes e após o estudo de simulação, verificando, assim, a alteração de mobilidade da globina.

A consequência de tal alteração pôde ser observada experimentalmente: a variante apresentou menor afinidade pelo oxigênio em seu estado *stripped*. Este evento, no entanto, foi estabilizado com a adição de IHP, fazendo com que a variante apresentasse propriedades funcionais semelhantes às da proteína nativa, provavelmente devido à interação do IHP com o resíduo substituído, estabilizando o deslocamento da hélice E e, provavelmente, não causando alteração da posição da histidina distal; bem como devido à presença de cerca 8% de HbF (que apresenta p50 menor quando adicionado efetor alostérico). Entretanto, um breve aumento da afinidade foi observado nestas condições quando em pH alcalino (entre 8,0 e 8,6), talvez devido ao excesso de íons negativos. A maior presença aniônica deve possivelmente promover maior interação com o resíduo substituído, o que levaria à maior abertura do *heme pocket* e à entrada de oxigênio junto ao grupamento ferroso. Ainda assim, se faz importante considerar, neste caso, a presença de cerca de 8% de HbF a interferir no aumento da afinidade do hemolisado total pelo oxigênio. Para se verificar se tal interação com IHP realmente ocorre serão necessários mais experimentos de MD. Cumpre salientar que esta hipótese é reforçada pelo fato de que a cooperatividade entre as cadeias globínicas, na presença de IHP, encontra-se ligeiramente diminuída.

Uma outra variante descrita com troca de resíduo na mesma posição 65, a Hb J-Cairo ($\beta 65(E9) \text{ Lys} \rightarrow \text{Gln}$), apresenta características funcionais semelhantes às da Hb S-São Paulo, ou seja, cooperatividade e afinidade diminuídas (GAREL et. al., 1976), sugerindo que a posição 65 tem um papel indireto, mas importante, na ligação Hb-O₂.

Dado ao fato de que a substituição $\beta 65$ (Lys→Glu) promove redução da afinidade pelo oxigênio, a Hb S-São Paulo, que também é Hb S, pode, no estado desoxi, polimerizar com maior facilidade, conforme observado nos testes de solubilidade (Tabela 1).

Outra variante descrita que apresenta perfil semelhante é a Hb Jamaica-Plain ($\beta 6(A3)$ Glu→Val; $\beta 68(E12)$ Leu→Phe) (GEVA et al., 2004). Seu portador, um bebê do sexo feminino de 19 meses, via de regra assintomático, sofreu uma crise de falcização e evento de cianose durante um voo para a Jamaica. Quando tratado, as análises revelaram que a dupla alteração da Hb, mesmo em heterozigose, foi responsável pelas manifestações clínicas agudas apresentadas, já que a alteração na posição 68 reduzia a afinidade pelo O_2 , levando a hemoglobina a polimerizar com maior intensidade e rapidez.

6.2.Variantes Raras

6.2.1.Variantes de Globina Alfa

f) Hb Iwata ($\alpha 87$ (F8) His $\rightarrow$ Arg)

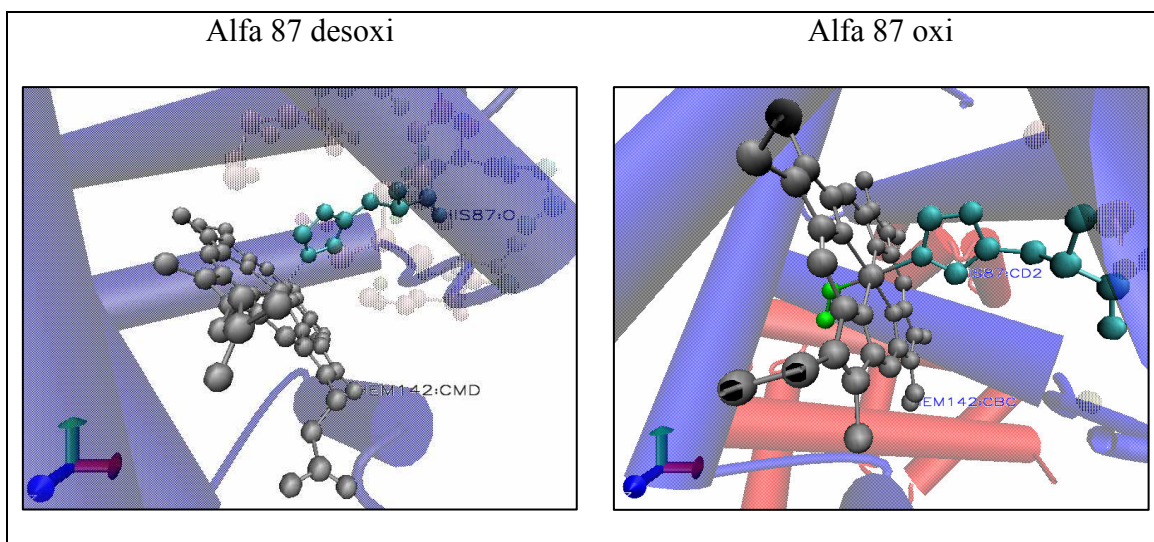


Figura 60. Resíduo 87 da cadeia alfa - Estrutura nativa (2DN2 e 2DN1).

A Hemoglobina Iwata ($\alpha 87$ (F8) His $\rightarrow$ Arg) é resultado da substituição da histidina proximal da cadeia alfa por uma arginina. Sua portadora não apresenta sintomatologia clínica, mas os estudos funcionais realizados demonstraram diminuição considerável do efeito Bohr do hemolisado total em seu estado purificado. Conforme pode ser visualizado na Figura 60, que representa a estrutura normal, a histidina 87 (hélice F da cadeia alfa) está diretamente ligada ao átomo de ferro do grupamento *heme*. Este resíduo, de características polares básicas, liga-se ao ferro de maneira a atrair para si a nuvem elétrica no entorno do ferro. Deste modo, este grupamento torna-se um bom ligante ao oxigênio, pois seus elétrons serão atraídos para o ferro (que por sua vez está ligado à histidina proximal).

A arginina, como a histidina, é também um aminoácido de características polares, mas é muito mais básico. Estes grupos, em pHs mais alcalinos, onde há maior concentração

de íons OH^- , serão protonados, o que possivelmente faça com que o oxigênio do meio não se ligue de modo eficiente aos átomos de ferro (uma vez que terá maior interação com o resíduo substituído), diminuindo, deste modo, a afinidade pelo oxigênio. Por conseguinte, há a diminuição do efeito Bohr, conforme foi observado nos experimentos *in vitro*.

Além de afetar a ligação com o oxigênio, tal substituição também altera consideravelmente a cooperatividade. De acordo com os resultados encontrados, a cooperatividade, na variante *stripped*, é maior em relação à proteína nativa, independentemente das variações de pH do meio, apresentando um comportamento linear. Isto significa que as subunidades interagem entre si por maior tempo, para a promoção das mudanças conformacionais $\text{T} \rightarrow \text{R}$ e vice-versa, comportando-se da mesma maneira em qualquer pH. Compreendendo-se que a alteração $\text{His} \rightarrow \text{Arg}$ resulta em maior dificuldade de ligação entre o oxigênio e o grupamento *heme*, tem-se como consequência a necessidade de maior tempo para interação entre as globinas.

Quando o IHP, por sua vez, é adicionado, o efeito inverso ocorre, nos pHs mais ácidos, por conta da ionização da arginina e estabilidade conferida pela estrutura do IHP à variante.

Esta proteína, na porcentagem de 11,3%, não confere sintomatologia clínica à sua portadora, possivelmente em função das interações moleculares que ocorrem *in vivo* (com cloretos, sódio, ATP, entre outros) e que não foram estudadas *in vitro*; essas interações são capazes de estabilizar a variante, conforme os experimentos com IHP demonstraram.

g) Hb Sunshine Seth ($\alpha 94$ (G1) Asp→His)

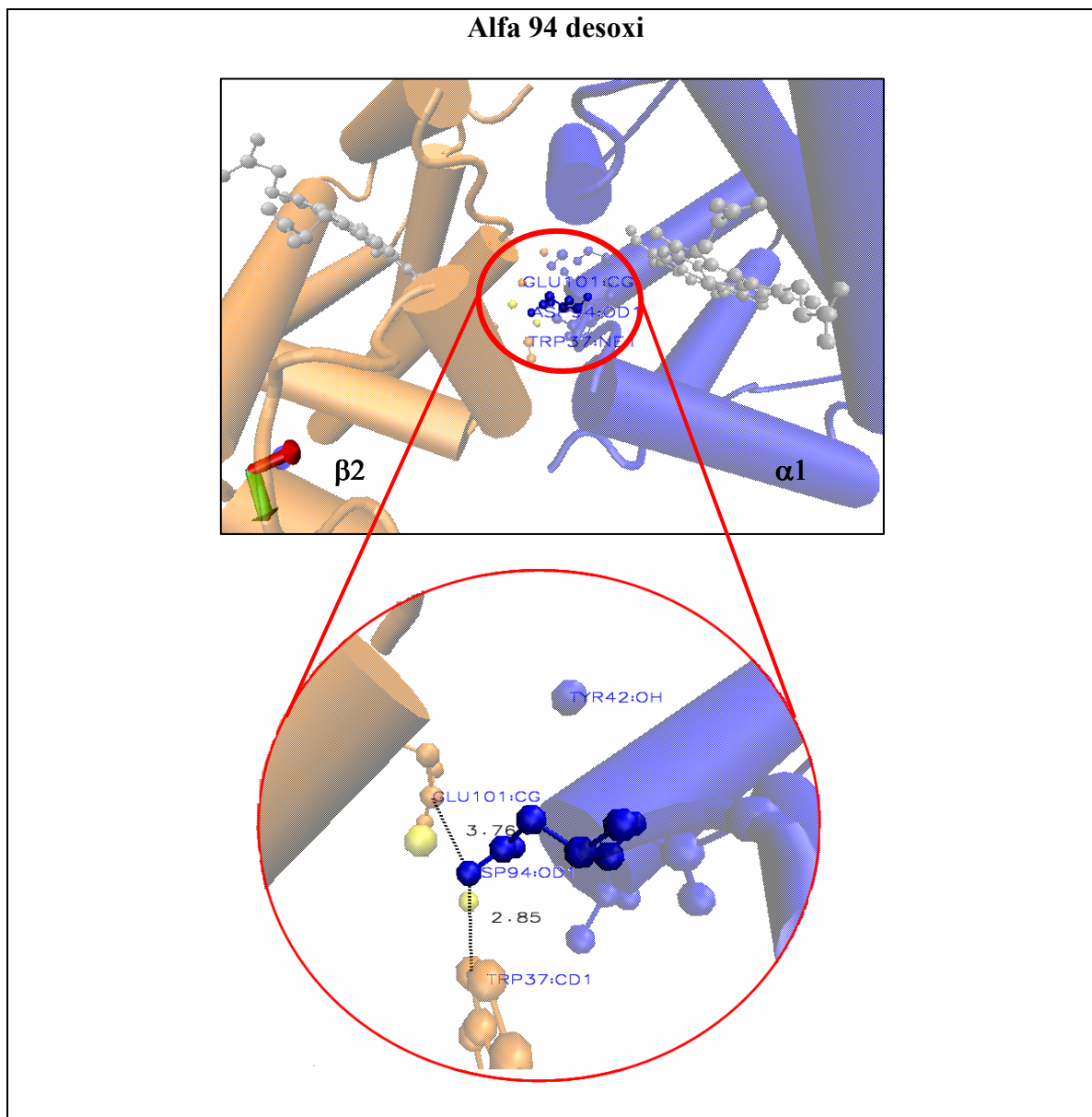


Figura 61. Resíduo 94 da cadeia alfa - Estrutura nativa (2DN2).

A Hb Sunshine Seth ($\alpha 94$ (G1) Asp→His) foi primeiramente descrita por Schroeder e colaboradores, em 1979. Sua caracterização funcional, entretanto, só foi elucidada em 1998, por Bard et al., que indicaram que a variante teria afinidade diminuída pelo oxigênio.

Os experimentos, no entanto, foram realizados com a variante isolada da fração normal, não havendo relatos de estudos do comportamento desta proteína frente à presença de IHP.

Em acordo com os achados de Bard et al., nossos resultados, ainda que obtidos do estudo de hemolisado total com pequena concentração da variante (15,6%), demonstraram afinidade reduzida pelo O₂. Quando adicionado o fosfato polianiónico na solução de trabalho, porém, a afinidade da Hb Sunshine Seth pelo ligante aumentou. Isso, possivelmente, se deve à substituição Asp→His, que ocorre em região de contato $\alpha 1\beta 2$ (Figura 61), onde o ácido aspártico interage mais diretamente com o triptofano 37 (C3)-resíduo polar neutro- e com o ácido glutâmico 101 (G3)- resíduo polar ácido, ambos na cadeia beta. Com a substituição deste resíduo pela histidina (polar básico), alteram-se as interações, que, provavelmente, se tornam mais intensas. Assim sendo, tem-se maior estabilidade da estrutura molecular na conformação T, o que explicaria a menor afinidade da variante pelo oxigênio.

Já a afinidade aumentada, observada experimentalmente, pode ser em decorrência justamente da maior interação entre os referidos aminoácidos, que dificultaria a entrada do IHP em região próxima, localizada nas cadeias beta. Entretanto, somente estudos de dinâmica molecular desta variante frente aos referidos ligantes (O₂ e IHP) poderão elucidar se tais hipóteses explicam seu comportamento funcional.

6.2.2. Variantes de Globina Beta

h) Hb Deer Lodge ($\beta 2(\text{NA}2)$ His $\rightarrow$ Arg)

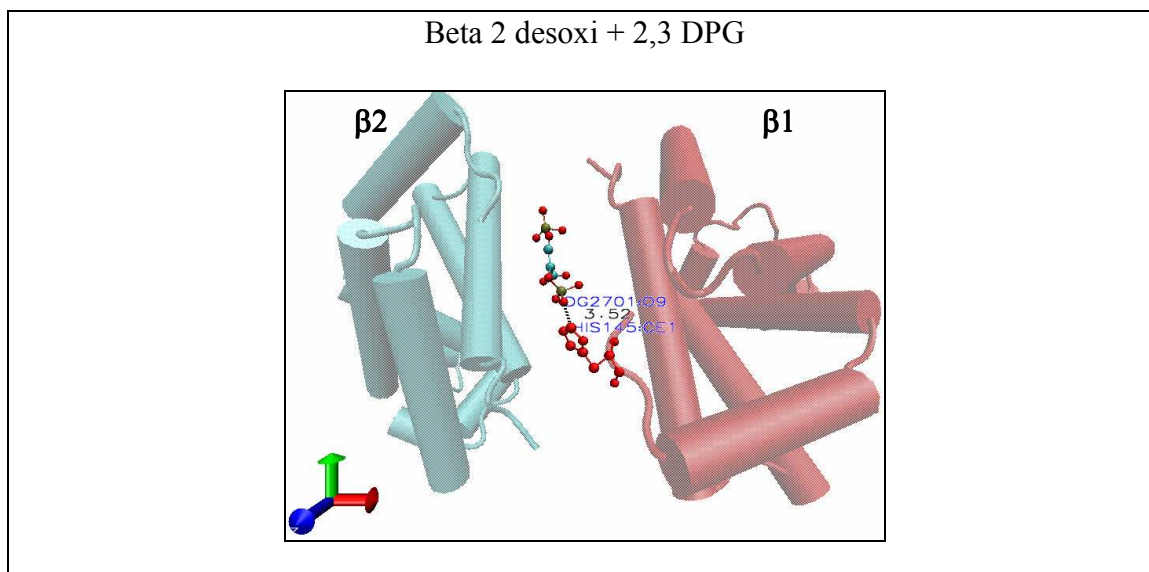


Figura 62. Resíduo 2 (histidina) da cadeia beta, em interação com 2,3DPG - Estrutura nativa (1B86).

O segundo resíduo da cadeia beta (histidina) não tem importantes interações diretas com aminoácidos da cadeia mais próxima (outra subunidade beta). No entanto, interage ativamente com o ligante 2,3 Difosfoglicerato (2,3DPG), e, juntamente com demais resíduos deste entorno, forma um sítio heterotrópico nesta região (Figura 62).

Com a troca deste aminoácido básico por outro com maior propriedade alcalina – arginina - tem-se uma afinidade aumentada pelo oxigênio. Deste modo, a substituição ocorrida de His $\rightarrow$ Arg promove alteração na densidade de cargas positivas no sítio de ligação. Sua alteração funcional é assim decorrente do aumento da frequência e extensão de flutuações conformacionais da estrutura desoxi, o que permitiria um aumento da afinidade pelo O_2 (BONAVENTURA et al., 1998) e menor afinidade ao 2,3DPG ou ao IHP neste sítio heterotrópico.

Interessante é observar que na concentração em que a variante se encontrava no hemolisado por nós analisado (de pouco mais que 50%) não foi possível, no estado *stripped*, detectar alteração funcional significativa, o que foi encontrado por Bonaventura et al. (1975), com a fração anômala isolada. Como a substituição se deu no sítio heterotrópico relativo ao 2,3DPG, estas alterações de afinidade e a menor cooperatividade entre as cadeias globínicas foram melhor percebidas, em nossos experimentos, quando adicionado o fosfato orgânico, tornando nossos achados similares aos da literatura. Outra alteração significativa detectada, quando adicionado IHP, foi a interferência aniônica na ligação da proteína com a molécula de O₂. Nos experimentos realizados com HEPES, sem adição de NaCl, verificou-se que a afinidade da variante pelo oxigênio diminuiu conforme o aumento do pH.

É importante ressaltar que, na concentração de cerca de 50%, o portador desta variante não apresenta sintomatologia clínica, o que reforça a tendência à normalidade observada nos estudos funcionais com a Hb Deer Lodge em seu estado *stripped*, sem a interferência de outras moléculas.

i) Hb Deer Lodge ($\beta 2(\text{NA}2)$ His $\rightarrow$ Arg) + Hb S ($\beta 6(\text{A}3)$ Glu $\rightarrow$ Val)

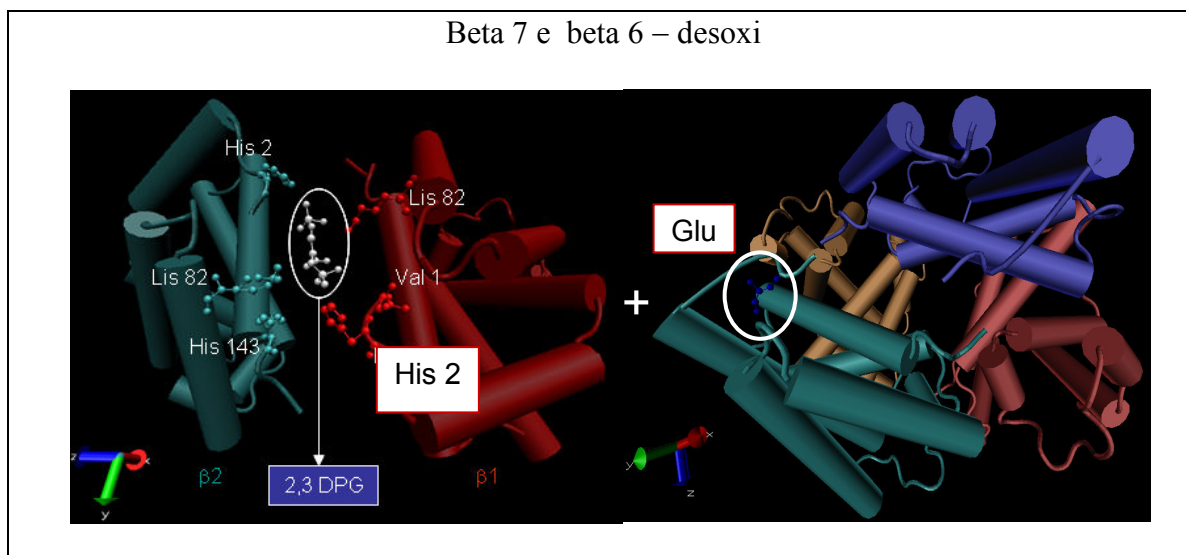


Figura 63. Resíduo 2 (histidina) da cadeia beta1, em interação com 2,3DPG, e resíduo 6 (ácido glutâmico) da cadeia beta 2 - Estrutura nativa (1B86).

Através do estudo funcional foi possível verificar que a HbS não interfere significativamente na afinidade da Hb Deer Lodge pelo O_2 quando em seu estado *stripped* – se comparados aos resultados obtidos com hemolisado contendo Hb Deer Lodge e Hb normal *stripped*. Entretanto, se compararmos os resultados funcionais obtidos da Hb Deer Lodge (discussão da variante anterior) frente à presença de hexafosfato e aqueles realizados com o hemolisado Hb S + Hb Deer Lodge, nas mesmas condições, acredita-se na possibilidade de interação entre os tetrâmeros.

Isso porque a Hb S, que sofre a substituição em $\beta 6$ (Glu $\rightarrow$ Val), interferiu no Efeito Bohr e na afinidade aumentada apresentada pela Hb Deer Lodge (cuja substituição se dá em $\beta 2$ His $\rightarrow$ Arg). Interessante notar que a cooperatividade entre globinas também parece sofrer interferência devido à soma da presença de ambas as variantes, porém de modo

menos positivo à função das hemoglobinas no hemolisado total. Pois as subunidades são menos cooperativas entre si, conforme resultados de experimentos com IHP. Estas duas variantes em concomitância, portanto, demonstraram menor mobilidade estrutural e a interação entre *hemes* do hemolisado, sem que a afinidade, no entanto, fosse influenciada negativamente.

Importante lembrar que o portador dessas variantes não apresenta doença falciforme. Isto provavelmente porque a maior afinidade pelo oxigênio, conferida pela Hb Deer Lodge, dificultaria a polimerização promovida pela Hb S (Figura 63), na forma desoxi.

j) Hb G-Siriraj ($\beta 7$ (A4) Glu→ Lys)

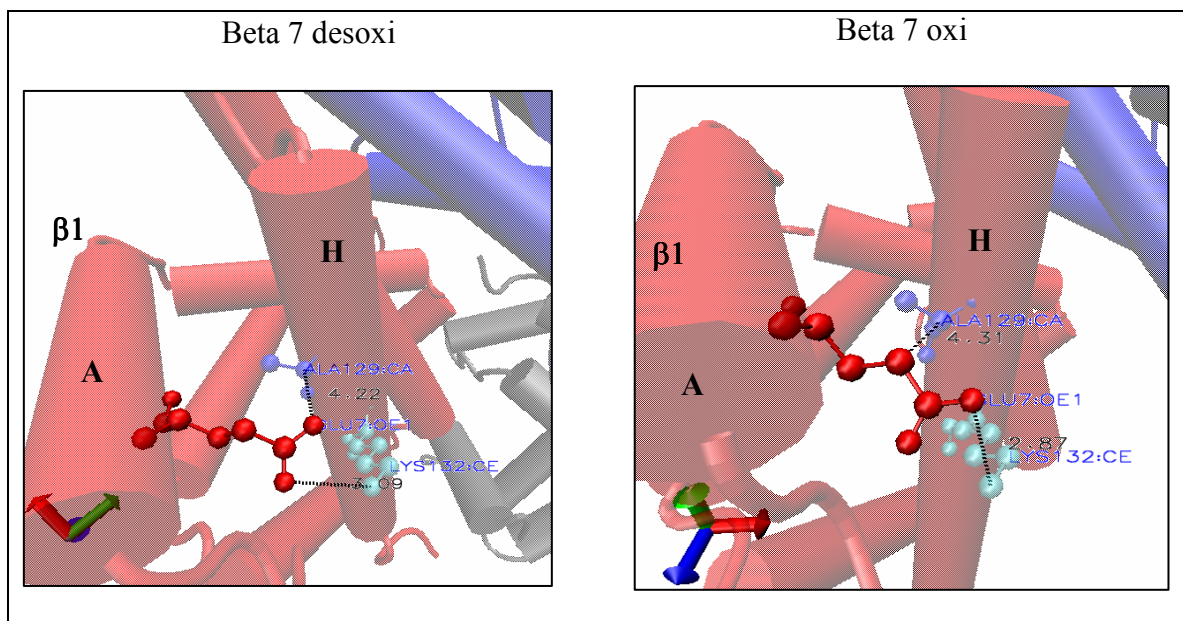


Figura 64. Resíduo 7 da cadeia beta - Estrutura nativa (2DN2 e 2DN1).

A Hb G-Siriraj é uma variante que sofreu substituição de ácido glutâmico por lisina na posição 7 da cadeia beta - 4º resíduo da hélice A, em região voltada à parte externa da proteína. Clinicamente não resulta em manifestações (BLACKWELL et al., 1972), conforme pôde ser observado em sua portadora, que apresentava 25,9% da variante (Tabela 1). Os casos descritos da Hb G-Siriraj são provenientes de famílias chinesas e tailandesas, sendo este, de nosso conhecimento, o primeiro em nosso país. Não há também caracterização funcional desta proteína na literatura.

O ácido glutâmico na posição 7 da cadeia beta interage com a alanina 129 (H7) e com a lisina 132 (H10) - ambas na hélice H da mesma globina. A interação com a alanina é pouco significativa, mas a interação com a lisina 132 (resíduo de caráter polar básico) resulta em ligação de hidrogênio quando a hemoglobina está em seu estado oxigenado (Figura 64). A substituição do ácido glutâmico (resíduo polar ácido) por lisina (polar

básico) promove, possivelmente, uma repulsão entre a lisina agora na posição 7 e a lisina na posição 132, não havendo, portanto, a formação de tal ligação, o que desestabilizaria a estrutura da molécula. Isto pôde ser observado experimentalmente através da cooperatividade alterada, tanto no estado *stripped*, quanto na presença de IHP.

No estado purificado, a Hb G-Siriraj demonstrou efeito cooperativo muito discrepante da estrutura nativa. Enquanto o pH do meio estava ácido, os valores de cooperatividade foram muito acima do normal, possivelmente em decorrência de interação do ambiente catiônico com o resíduo substituído, que não mais interagiria com a lisina 132, levando um tempo maior para interação entre as cadeias. Conforme a diminuição do pH, um ambiente aniônico seria criado, facilitando a interação entre as lisinas devido à protonação de seus grupamentos amina. Em contrapartida, a afinidade pelo oxigênio, nestes pHs mais alcalinos, mostrou-se discretamente reduzida.

Quando adicionado IHP, o evento observado foi inverso: houve pequena redução da cooperatividade e elevação da afinidade. Isso possivelmente se deve à maior dificuldade de inserção do IHP no sítio heterotrópico, dada a carga final da variante. Consequentemente, os valores de cooperatividade e de afinidade pelo O₂ foram menores em relação à proteína normal. De acordo com os resultados encontrados, o pH também parece interferir na afinidade da proteína pelo oxigênio, quando na presença de IHP: o efeito Bohr aumentado se deve à maior afinidade da Hb G-Siriraj pelo oxigênio em pHs mais ácidos.

Uma outra variante, com substituição do ácido glutâmico por glicina nesta mesma posição (β 7), é a Hb G-San José (SCHWARTZ e SPAET, 1955); sua presença, em

concomitância à Hb A, não resulta em alterações funcionais⁴, possivelmente devido à neutralidade deste resíduo.

k) Hb G-Siriraj ($\beta 7$ (A4) Glu→Lys) + Hb C ($\beta 6$ (A3) Glu→Lys)

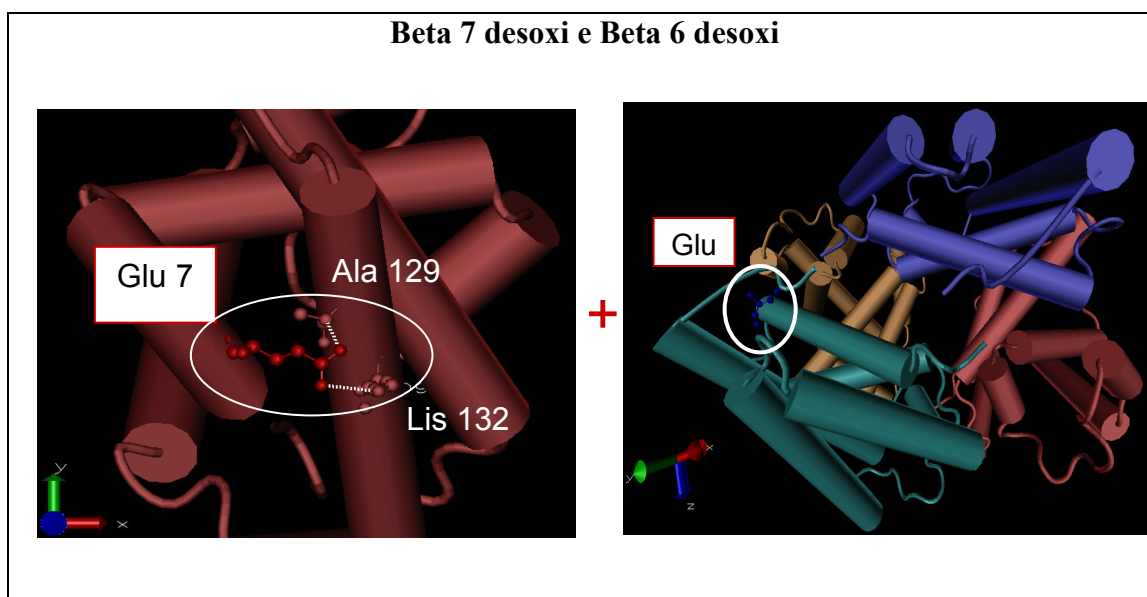


Figura 65. Resíduos 7 e 6 da cadeia beta - Estrutura nativa (2DN2).

A associação das Hb G-Siriraj ($\beta 7$ (A4) Glu→Lys) e Hb C ($\beta 6$ (A3) Glu→Lys) conferiu quadro clínico de anemia hemolítica à sua portadora. Uma das possíveis razões é a instabilidade protéica apresentada por essas variantes, conforme os testes de instabilidade efetuados (Tabela 1). É preciso considerar também que a substituição de aminoácidos na Hb G-Siriraj, assim como na Hb C, influencia no co-transporte de íons K^+/Cl^- nos eritrócitos, promovendo o desbalanceamento de cargas devido à sua interação com a membrana celular. Desta maneira, a membrana se torna mais rígida e mais resistente à entrada e saída de água (OLIVIERI et al., 1992). A soma das duas variantes é, portanto,

⁴ <http://globin.cse.psu.edu>

responsável pelas deformações celulares observadas nas hemácias analisadas da portadora (Tabela 1).

As substituições sofridas nas posições 6 e 7 das cadeias beta são as mesmas, de ácido glutâmico (resíduo polar ácido) por lisina (polar básico). Estes resíduos apresentam seus grupamentos laterais voltados para a porção externa da hemoglobina, promovendo pouca interação direta com aminoácidos da proteína (Figura 65), à exceção da interação lisina 7 - lisina 132, que parece demonstrar certa relevância - conforme discutido anteriormente.

A associação destas duas variantes resulta, do ponto de vista funcional, em perfil semelhante ao da Hb C em sua ligação com o oxigênio, onde há interferência significativa dos pHs alcalinos possivelmente devido à alteração da carga final da proteína (ANTONINI e BRUNONI, 1971). O efeito Bohr da variante no estado *stripped*, por conseguinte, mostrou-se diminuído. A cooperatividade, neste estado, também ficou prejudicada resultando em valores de n acima daqueles encontrados na Hb nativa. Isso se deve, teoricamente, à interação iônica que também foi responsável pela alteração da afinidade. Quando o fosfato polianiónico foi adicionado, no entanto, uma tendência à normalidade de afinidade aos ligantes (tanto IHP quanto o O₂) foi observada, possivelmente devido à estabilidade protéica conferida pelo hexafosfato. Apesar da afinidade normal, a cooperatividade foi anormal. Os valores encontrados foram muito menores do que os da proteína nativa, possivelmente devido à interação com o inositol. Estudos de MD serão importantes para elucidar a relação desta substância com as proteínas mutantes – tanto a Hb C quanto a Hb G-Siriraj.

Interessante, no entanto, ressaltar que, enquanto a Hb G-Siriraj demonstrou afinidade aumentada pelo O₂ na presença de IHP comparada à Hb nativa, a associação dela com a Hb C resultou na inversão deste comportamento, que, apesar disso, não causou modificação da cooperatividade. Tal resultado aponta para uma importante influência de do pH do meio na sua ligação com o oxigênio.

l) Hb M-Saskatoon (β63 (E7) His→Tyr)

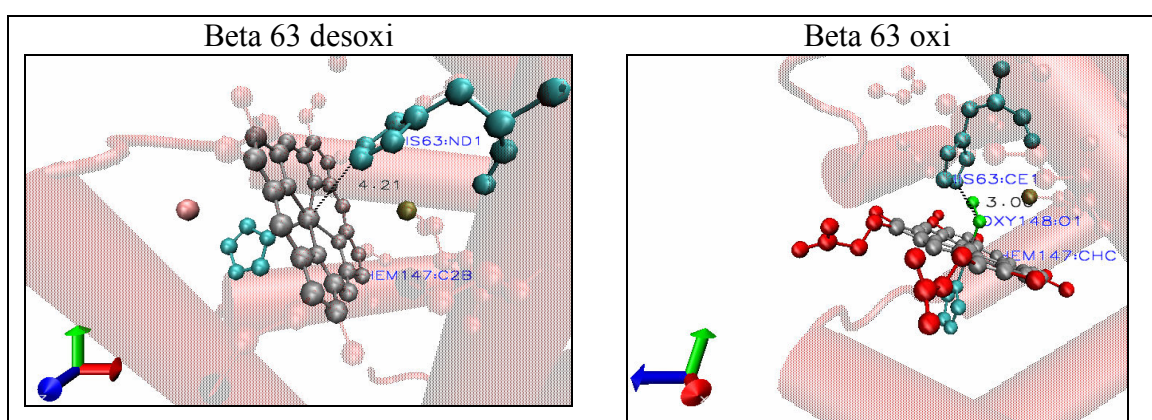


Figura 66. Resíduos 7 e 6 da cadeia beta - Estrutura nativa (2DN2 e 2DN1).

A Hb M-Saskatoon (β63 His→ Tyr) é resultado da substituição da histidina distal da cadeia beta (posição 63, na hélice E), que, *in vivo*, gera um quadro de cianose aos seus portadores por apresentar afinidade diminuída pelo oxigênio (ANTONINI e BRUNONI, 1971).

Estruturalmente, a histidina distal interage com a molécula de oxigênio por meio de ponte de hidrogênio, que por sua vez está ligada ao átomo de ferro do grupo *heme*, quando da proteína em seu estado R. Já no estado desoxigenado, este aminoácido fica a uma distância considerável do grupamento, conforme pode ser observado na Figura 66, obtida através das estruturas 2DN1 e 2DN2 depositadas no *Protein Data Bank*.

Com a substituição da histidina (de caráter polar básico) pela tirosina (neutra), há menor interação entre o complexo resíduo 63- O₂- heme, havendo a possibilidade dos átomos de ferro sofrerem oxidação pelo oxigênio presente no meio, sem que haja o transporte efetivo destes átomos para os tecidos periféricos, o que geraria o quadro de cianose. Apesar da formação de meta-Hb durante o processo experimental, o evento de afinidade diminuída devido à oxidação do grupo ferroso não foi observada. Em acordo com os resultados obtidos por Nishikura et al. em 1975, a variante apresentou afinidade aumentada, talvez pela dimerização do tetrâmero, por conta da alta instabilidade protéica (Tabela 1).

m) Hb Redondo (β 92 (F8) His $\rightarrow$ Asn)

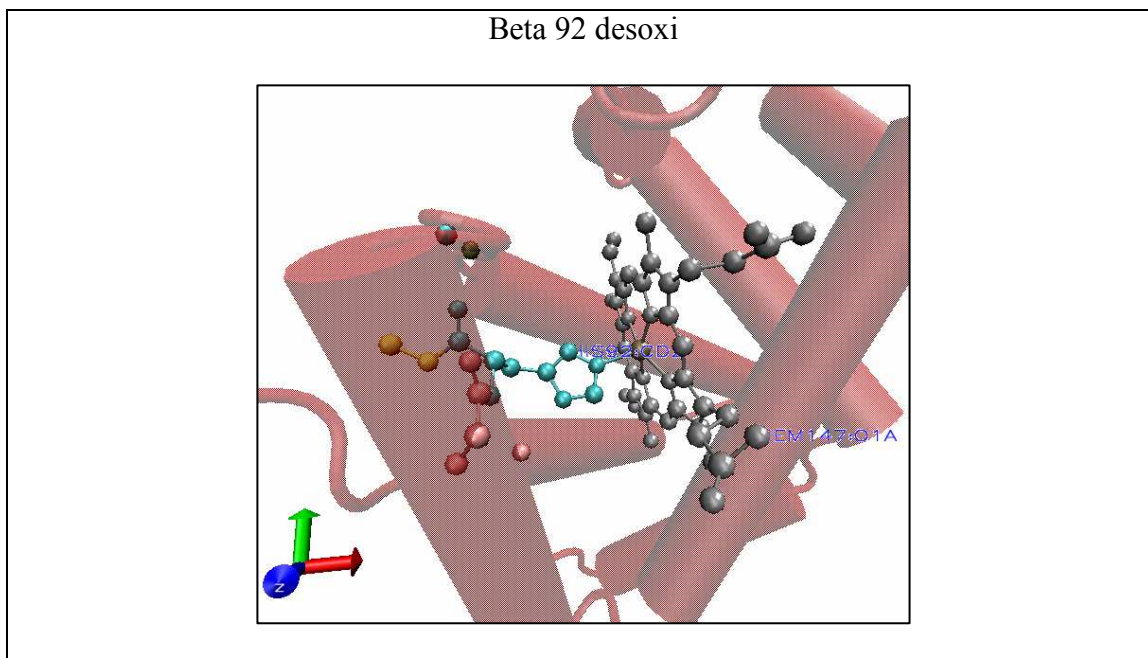


Figura 67. Resíduos 92 da cadeia beta - Estrutura nativa (2DN2).

A Hb Redondo ($\beta 92$ (F8) His $\rightarrow$ Asn) é consequência da substituição de histidina proximal (Figura 67) por asparagina na cadeia beta, o que confere à proteína afinidade ligeiramente aumentada pelo oxigênio e uma certa redução da cooperatividade (WAJCMAN et al., 1991). Nossos resultados foram concordantes com aqueles encontrados anteriormente por Wajcman et al., mas a diminuição da cooperatividade somente foi observada quando adicionado IHP, possivelmente por conta da baixa concentração desta variante no hemolisado total (13%).

A asparagina é um resíduo polar neutro e devido à menor doação de cargas negativas para o *heme* leva a uma maior avidez deste pela ligação com o oxigênio. Deste modo, confere à proteína maior afinidade por este ligante. Em contrapartida, como a ligação entre o grupo *heme* e a cadeia globínica, através do resíduo 92, está enfraquecida, a proteína apresenta menor estabilidade (HARANO et al., 1991), conforme foi verificado nos testes laboratoriais (Tabela 1).

Devido à maior afinidade pelo oxigênio e ao enfraquecimento da interface entre a subunidade globínica e o *heme*, a cooperatividade entre as cadeias é prejudicada, apresentando valores menores que os normais (WAJCMAN et al. em 1991).

Comparando-se as Hbs Redondo e Iwata, que sofrem substituição da histidina proximal (a primeira na cadeia β e a segunda na cadeia α), observa-se comportamentos funcionais opostos. Isso porque enquanto o resíduo asparagina, referente à Hb Redondo, confere maior afinidade à variante, a arginina resulta na afinidade diminuída em pH alcalino. Deste modo, salienta-se a importância fundamental de análise teórica dos resíduos nativos e substituídos, bem como suas possíveis interações na estrutura final da hemoglobina, para que se compreenda melhor o comportamento funcional da variante.

n) Hb Köln ($\beta 98$ (FG5)Val $\rightarrow$ Met)

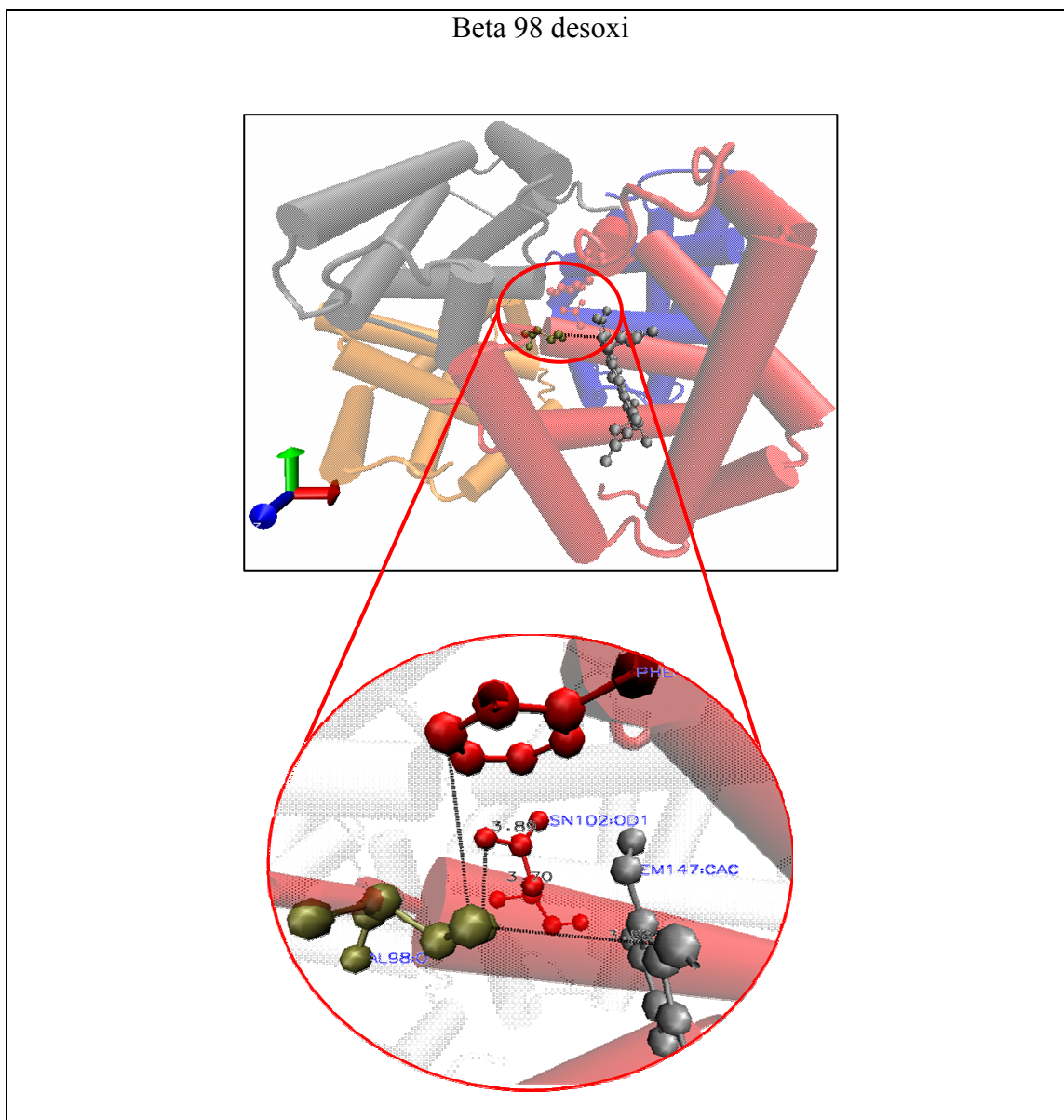


Figura 68. Resíduos 92 da cadeia beta - Estrutura nativa (2DN2).

A substituição do resíduo valina na posição 98 (quinto aminoácido da região inter-hélice FG) da cadeia beta por metionina, resultando na variante Hb Köln, foi descrita primeiramente por Pribilla et al. (1965), com caracterização funcional feita somente em 2001, por Imai e colaboradores, os quais verificaram capacidade de afinidade pelo oxigênio

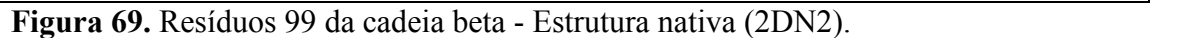
aumentada e propriedade de ligação normal, quando na presença de 2,3 DPG, além de ausência de cooperatividade.

Embora em nossos experimentos o hemolisado contendo a Hb Köln tenha apresentado comportamento similar ao descrito acima quando da adição de IHP, os resultados das análises com a hemoglobina *stripped* revelaram uma afinidade discretamente reduzida pelo oxigênio. Cumpre salientar que Imai et al. não testaram o hemolisado purificado. A metodologia empregada, automatizada - equipamento Hemox-Analyser[®] (TCS Scientific, USA), não promove a purificação protéica prévia. Deste modo, a proteína de interesse esteve susceptível a interferentes contidos na própria amostra, como o 2,3DPG, ATP e íons. Um outro dado é que a concentração da variante analisada em nosso laboratório, no hemolisado total, era de apenas 9,1%.

A valina 98 da cadeia beta interage com diversos aminoácidos localizados nesta porção interna da proteína. Destacam-se, principalmente, a asparagina 102 (G4), a fenilalanina 41 (C7) e o grupamento *heme*, conforme demonstrado na Figura 68 - obtida no VMD a partir da estrutura 2DN2 da proteína nativa. Relaciona-se, portanto, com diferentes hélices da globina, sem mencionar sua interação com o grupo *heme*, o que demonstra que sua substituição pode ser crítica para a molécula de hemoglobina.

Apesar da valina e da metionina (relativa à Hb Köln) não serem consideradas resíduos polares, o segundo aminoácido apresenta grau de hidropatia maior em relação ao primeiro. Deste modo, ele é responsável pela desestabilização protéica através de possível aproximação de moléculas de água nesta região, o que alteraria a interação entre os resíduos e possivelmente com o grupo *heme*- explicando a cooperatividade diminuída entre

Beta 00 desoxi



importância significativa na afinidade do tetrâmero pelo oxigênio (Figura 69). Independentemente do aminoácido substituído nesta mesma posição nas variantes Hb Ypsilanti ($\beta 99 \text{ Asp} \rightarrow \text{Tir}$), Hb Yakimabeta ($\beta 99 \text{ Asp} \rightarrow \text{His}$), Hb Kempsey ($\beta 99 \text{ Asp} \rightarrow \text{Asn}$), Hb Hotel-Dieu ($\beta 99 \text{ Asp} \rightarrow \text{Gli}$), Hb Radcliffe ($\beta 99 \text{ Asp} \rightarrow \text{Ala}$), Hb Chemilly ($\beta 99 \text{ Asp} \rightarrow \text{Val}$) e Hb Coimbra ($\beta 99 \text{ Asp} \rightarrow \text{Glu}$), o resultado foi sempre o mesmo, de afinidade aumentada pelo oxigênio, resultando em policitemia aos seus portadores⁵. A substituição do ácido aspártico 99 da cadeia beta por ácido glutâmico, na Hb Coimbra, entretanto, teoricamente não deveria ser tão crítica, uma vez que estrutural e quimicamente estes resíduos são semelhantes, diferentemente do que ocorre na Hb Ypsilanti, cuja substituição é feita pela tirosina - o que resulta em perda de interações com as cadeias alfa e possível criação de um novo estado estrutural da hemoglobina (SMITH et al., 1991). Deste modo, sugere-se que, assim como a variante Ypsilanti, a Hb Coimbra seja também melhor estudada do ponto de vista estrutural, para maior elucidação das interações químicas que possam estar levando ao comportamento funcional anômalo.

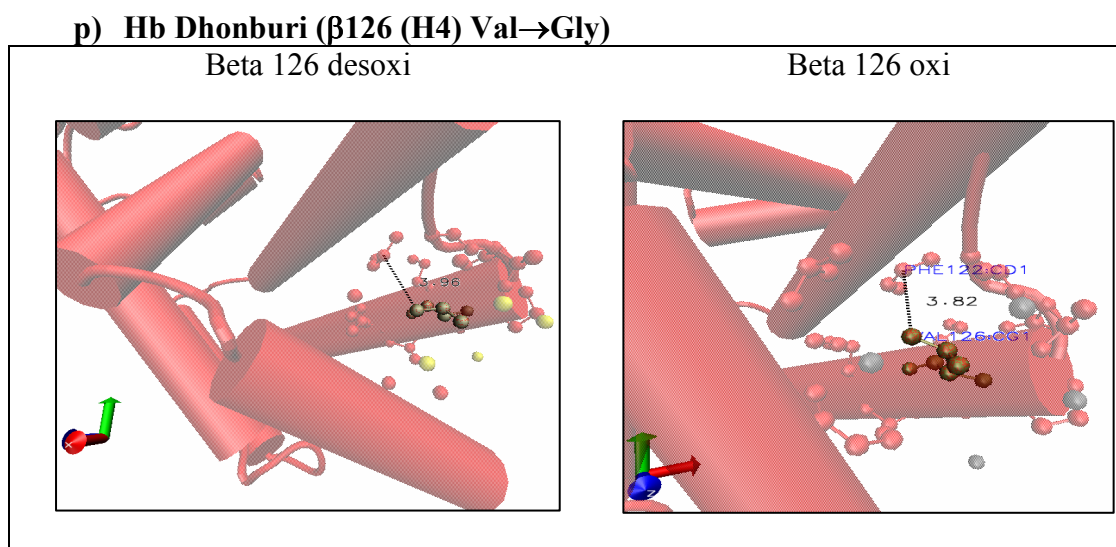


Figura 70. Resíduos 126 da cadeia beta - Estrutura nativa (2DN2 e 2DN1).

⁵ <http://globin.cse.psu.edu>

O resíduo $\beta 126$, quarto aminoácido da hélice H, parece ter diversas interações com outros aminoácidos da mesma cadeia beta, segundo observação da estrutura nativa através do programa VMD. Importante ressaltar que interage principalmente com a Fenilalanina 122 (cuja substituição por serina, resulta na Hb Caruaru, discutida anteriormente). Apesar de estar parcialmente voltada para um bolsão hidrofóbico da globina e ter interações diversas com resíduos desta subunidade, parte do aminoácido também sofre breves interferências de moléculas de água presentes no meio externo à proteína, conforme demonstra a Figura 70 (em amarelo na desoxi-Hb e em cinza na oxi-Hb). Supõe-se que sua substituição por glicina (que assim como a valina também não é polar) pode levar à maior interação com estas moléculas de água, por conta de seu grau de hidropatia. Deste modo, a entrada de água na estrutura tetramérica conferiria à Hb Dhonburi a instabilidade observada (Tabela 1) e a redução na cooperatividade entre os *hemes* - principalmente quando adicionado IHP. Como resultado final, verificou-se a diminuição da afinidade da variante pelo oxigênio. Em contrapartida, a proteína no estado *stripped* demonstrou discreto aumento da cooperatividade (nos pHs alcalinos) e consequente diminuição da afinidade pelo oxigênio nos pHs extremos – o que aponta para uma forte influência dos íons presentes no meio. Mais uma vez, estudos estruturais mais aprofundados poderiam melhor explicar o comportamento funcional desta proteína.

CONCLUSÃO

Através do presente projeto foi possível avaliar, complementar e melhor esclarecer o comportamento funcional de diversas variantes de cadeias alfa e beta da hemoglobina humana e, deste modo, compreender melhor suas consequências clínicas. Verificou-se que apesar da metodologia artesanal, o estudo funcional da hemoglobina, como descrito por Rossi-Fanelli e Antonini, em 1958, ainda consiste em importante ferramenta, não somente para a completa caracterização das variantes estruturais, mas também em estudos básicos da bioquímica da molécula. Isso porque, através das hemoglobinas anormais, é possível verificar ou confirmar a importância de certos resíduos e seus posicionamentos na estrutura nativa, bem como seu papel na função final da proteína.

Em complementação aos estudos funcionais, a Dinâmica Molecular, quando realizada, em muito contribuiu para uma melhor interpretação dos resultados obtidos. Foi o caso de duas variantes de importância clínica, a Hb Caruaru ($\beta 122$ Phe→Ser) e a Hb S-São Paulo ($\beta 6$ Glu→Val ; $\beta 65$ Lys→Glu). Através dos estudos de dinâmica foi possível compreender as causas da afinidade diminuída pelo O₂ da Hb S-São Paulo, o que leva a uma maior propensão à polimerização dos tetrâmeros. Esses achados têm uma óbvia importância clínica. Assim como a Hb Jamaica-Plain ($\beta 6$ Glu→Val; $\beta 68$ Leu→Phe), que também sofreu substituição de dois aminoácidos na mesma cadeia beta, ambas podem polimerizar com maior facilidade por conta da afinidade diminuída conferida pelas substituições dos resíduos $\beta 65$ e $\beta 68$. No caso desta última variante, sua portadora sofreu crise de falcização durante um voo para a Jamaica, bem como quadro de cianose, que foi atenuado ao ser ministrado oxigênio.

Em relação à Hb Caruaru, a afinidade aumentada pelo O₂ é provavelmente devida à substituição de resíduo apolar por aminoácido polar - de menor tamanho, em bolsão

hidrofóbico. A dinâmica molecular, por sua vez, apesar do curto tempo de simulação, foi fundamental para visualização das perdas de interações ocorridas entre os aminoácidos e entrada de água na estrutura, demonstrando ser, portanto, uma importante ferramenta para melhor compreensão de resultados funcionais.

As demais variantes caracterizadas funcionalmente foram estudadas estruturalmente somente através da visualização da proteína nativa, como o caso da Hb Dhonburi, que, assim como a Hb Caruaru, sofre substituição em bolsão hidrofóbico da cadeia beta, porém em resíduo que também sofre breve influência de íons do meio externo à proteína. Através da simples visualização da estrutura normal foi possível vislumbrar as interações perdidas por ocasião das substituições sofridas, como é também o caso da Hb Boa Esperança, que ao perder a ligação de hidrogênio, tem, possivelmente, o potencial de interação com os ligantes (O_2 e IHP) diminuído.

Os resultados acima ilustram a complexidade das relações intermoleculares, tanto entre as globinas e com o grupamento *heme*, quanto com as moléculas externas. Algumas das substituições ocorridas, aparentemente sem grandes consequências para a molécula de hemoglobina e sem manifestações clínicas nos portadores, resultam em alteração da função *in vitro*, o que, por si só, demonstra a existência de muitas posições importantes para o comportamento funcional da molécula além daquelas já bem determinadas.

Substituições em regiões de interface, que aqui também foram analisadas através do estudo das Hbs Itapira e Bom Jesus da Lapa ($\alpha 1\beta 1$), Sunshine Seth e Coimbra ($\alpha 1\beta 2$), revelaram reflexos nas afinidades pelo oxigênio. Enquanto as duas primeiras comportaram-se com afinidade normal, as outras duas apresentaram, respectivamente, afinidades aumentada e diminuída - não somente por conta da posição do aminoácido substituído

(como no caso da Hb Coimbra, em que a posição 99 parece ter grande importância na afinidade protéica pelo O₂), mas também devido à natureza química deles (como na Hb Sunshine Seth, que sofreu troca Asp→His, também em posição de interface). Todas elas, no entanto, resultaram em alterações na cooperatividade entre as cadeias globínicas. Isso demonstra que, mesmo alterações na região $\alpha 1\beta 1$ —considerada de menor importância, assim como as substituições em $\alpha 1\beta 2$, precisam ser melhor estudadas, para maior compreensão dos mecanismos de interação das globinas.

Apesar da hemoglobina já ter sido extensivamente investigada, há ainda muitos mecanismos a serem elucidados, como a formação de conformações T ou R intermediárias, conforme ocorre nas variantes Hb Sunshine Seth e, possivelmente, na Hb Coimbra. Outra incógnita no mecanismo bioquímico desta proteína é a possibilidade interação entre as variantes de Hb. Através deste estudo verificou-se que há interação considerável, a ponto de resultar em alterações funcionais significativas quando da presença concomitante de duas variantes. As interações das Hbs Deer Lodge com S e G-Siriraj com C são exemplos de como a concomitância de variantes pode causar o agravamento do quadro clínico dos portadores em relação aos heterozigotos simples, dada a interação entre os diferentes tetrameros, responsável por funções de ligação ao oxigênio e cooperatividade diferenciados. Ainda foi possível verificar que não somente a concentração da variante no hemolisado total é importante, como também as condições analíticas. Este foi o caso da Hb Köln, cujos resultados foram discrepantes daqueles encontrados na literatura. As condições de análise, distintas, foram possivelmente responsáveis pelas diferenças encontradas, demonstrando que a proteína também interage com o meio externo (íons, água, etc.) de modo bastante relevante.

Nosso estudo ainda analisou alterações nas interações com o grupamento *heme*, através da análise das Hbs M-Saskatoon (substituição da histidina distal), Iwata e Redondo (substituição da histidina proximal, em cadeia alfa e globina beta, respectivamente). Foi possível verificar que o caráter químico do aminoácido substituído é de fundamental importância para a determinação da função da proteína - que haverá de se comportar com afinidade aumentada, como na Hb Redondo, ou diminuída, como no caso da Hb Iwata. Essas análises enfatizaram que as modificações nas cadeias beta tendem a conferir aos seus portadores quadros clínicos mais graves também em função da maior proporção da síntese da globina anômala, onde um gene mutado significa quase 50% de cadeias beta anormais, enquanto no caso dos genes alfa, um gene mutado ocasiona uma proporção bem menor do que esta, que normalmente varia de 10 a 25% da hemoglobina total.

Obviamente, a natureza química do aminoácido substituído (tamanho, polaridade, grau de hidropatia, entre outros aspectos) pode conferir instabilidade protéica devido a perdas de interações químicas antes estáveis. Justamente pela subtração de região que efetua tais interações que a Hb Olinda, por exemplo, que perdeu quatro aminoácidos no início da hélice B (-Glu-Val-Gly-Gly) das posições 22 a 25 da cadeia beta, apresenta instabilidade protéica. Porém, de modo surpreendente, foi possível seu estudo funcional, que revelou afinidade alterada: aumentada quando adicionado o IHP e diminuído na ausência (em comparação à Hb nativa, em ambas as condições), porém com valor médio de cooperatividade normal. A cooperatividade entre globinas, por outro lado, se analisada em diferentes pHs, se comporta de maneiras diversa. No caso da Hb Olinda, somente a observação simples da estrutura normal não nos permitiu explicar o comportamento funcional, demandando então os estudos de Dinâmica Molecular, já que a cristalografia desta proteína seria inviável devido à sua instabilidade.

Em conclusão, acreditamos que o conjunto de resultados aqui obtidos, que incluem o estudo funcional de 6 variantes novas e 11 variantes estruturais raras da hemoglobina humana, e sua complementação parcial com a ferramenta da Dinâmica Molecular, possa contribuir de maneira relevante com as Áreas de Bioquímica, Biofísica, Genética, Hematologia e Patologia Clínica, enfatizando a importância da interdisciplinaridade para a melhor compreensão da fisiopatologia das hemoglobinopatias e da bioquímica básica da molécula de hemoglobina, importante modelo no estudo de todas as demais proteínas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALDER BJ, WAINWRIGHT TE. Wainwright. Studies in Molecular Dynamics. I. General Method. J. Chem. Phys. 1959; 31: 459.

ANTONINI E, BRUNONI M. Hemoglobin and myoglobin in their reaction with ligands, ed. Amsterdam:North-Holland Publishing Company, 1971. p.435.V.21.

ARNONE A. X-ray Diffraction Study of Binding of 2,3-Diphosphoglycerate to Human Deoxyhaemoglobin. Nature. 1972; 237: 146 – 149.

BARD H, ROSENBERG A, HUISMAN TH. Hemoglobinopathies affecting maternal-fetal oxygen gradient during pregnancy: molecular, biochemical and clinical studies. Am J Perinatol. 1998;15:389-93.

BENESCH R, BENESCH RE. The effect of organic phosphates from the human erythrocyte on the allosteric properties of hemoglobin. Biochem Biophys Res Commun 1967; 26: 162.

BENESCH RE, BENESCH R, YU CI. The oxygenation of hemoglobin in the presence of 2,3-diphosphoglycerate. Effect of temperature, pH, ionic strength, and hemoglobin concentration. Biochemistry. 1969; 8: 2567-71.

BLACKWELL RQ, LIU CS, WANG CL. Haemoglobin Siriraj, -7 (A4) Glu leads to Lys, in a Chinese subject in Taiwan. Vox Sang. 1972; 23: 433-8.

BLACKWELL RQ, WENG MI, LIU CS, SHIH TB, WANG CL. Hemoglobin G Chinese in Chinese subjects in Taiwan. Vox Sang. 1972; 23:363-8.

BONAVENTURA C, TESH S, FAULKNER KM, KRAITER D, CRUMBLISS AL. Conformational fluctuations in deoxy hemoglobin revealed as a major contributor to anionic modulation of function through studies of the oxygenation and oxidation of hemoglobins A0 and Deer Lodge beta2(NA2)His →Arg. Biochemistry. 1998; 37: 496-506.

BONAVENTURA C, CRUMBLISS AL, WEBER RE. New insights into the proton-dependent oxygen affinity of Root effect haemoglobins Acta Physiol Scand. 2004;182:245-58.

BONAVENTURA J, BONAVENTURA C, SULLIVAN B, GODETTE G. Hemoglobin Deer Lodge (beta 2 His replaced by Arg). Consequences of altering the 2,3-diphosphoglycerate binding site. J Biol Chem. 1975;250:9250-5.

BONILLA-RODRIGUEZ,GO. Tese de Livre docência Hemoglobinas, com Ênfase naquelas de peixes e serpentes. 2007; pp5.

BONILLA-RODRIGUEZ GO, FOCESI JR A, BONAVENTURA J, CASHON RE. Functional properties of the hemoglobin from the South American Snake *Mastigodryas Bifossatus*. *Comp Bio and Physiol*.1994; 109: 1085-1095.

BUNN HF, FORGET BG. Hemoglobin: Molecular, Genetic and Clinical Aspects. 1.ed. Philadelphia, London, Toronto: W.B.Saunders Company, 1986.p.690.

CHANUTIN A, CURNISH RR. Effect of organic and inorganic phosphates on the oxygen equilibrium of human erythrocytes. *Arch Biochem Biophys*. 1967; 121: 96.

CIACCIO C, COLETTA A, DE SANCTIS G, MARINI S, COLETTA M. Cooperativity and allostery in haemoglobin function. *IUBMB Life*. 2008; 60:112-23.

COSTA FF, SONATI MF, ZAGO MA. Hemoglobin Stanleyville II (alpha 78 Asn-Lys) is associated with a 3.7-kb alpha-globin gene deletion. *Hum Genet*. 2002; 86: 319-20.

DACIE JV, LEWIS SM. Hematologia Prática de Dacie e Lewis, 9a. ed.,Artmed, Porto Alegre, 2006. p 571.

DUARTE DF, ALBUQUERQUE DM, PEREIRA PINHEIRO VR, COSTA FF, SONATI MF. Three new structural variants of fetal hemoglobin: Hb F-Campinas [$\text{Agamma g121(GH4)Glu} \rightarrow \text{Gln}$], Hb F-Paulinia [$\text{Ggamma 80(EF4)Asp} \rightarrow \text{Tyr}$] and Hb F-Joanopolis [$\text{Ggamma73(E17) Asp} \rightarrow \text{Ala}$]. *Haematologica*. 2003; 88:1316-7.

EATON WA, HENRY ER, HOFRICHTER J, BETTATI S, VIAPPIANI C, MOZZARELLI A. Evolution of allosteric models for hemoglobin. *IUBMB Life*. 2007 Aug-Sep;59(8-9):586-99.

FATTORI A, KIMURA EM, ALBUQUERQUE DM, OGO SH, STOPPA GR, MARTINS JT, LIMA CSP, SAAD STO, COSTA FF, SONATI MF. Polycythemia and Hb Coimbra [$\text{beta 99 (G1) Asp} \rightarrow \text{Glu}$] in Brazil. *Mol. Biol*. 2006; 29: 200-202.

GAREL MC, HASSAN W, COQUELET MT, GOOSSENS M, ROSA J, AROUS N. Hemoglobin J Cairo: beta 65 (E9) Lys leads to Gln, A new hemoglobin variant discovered in an Egyptian family. *Biochim Biophys Acta*. 1976; 420: 97-104.

GEVA A, CLARK JJ, ZHANG Y, POPOWICZ A, MANNING JM, NEUFELD EJ. Hemoglobin Jamaica plain--a sickling hemoglobin with reduced oxygen affinity. *N Engl J Med*. 2004; 351:1490-2.

GONÇALVES MS, SONATI MF, KIMURA M, ARRUDA VR, COSTA FF, NECHTMAN JF, STOMING TA. Association of Hb Santa Ana [$\alpha 2 \beta (2)88(F4)Leu \rightarrow Pro$] and Hb Porto Alegre [$\alpha 2 \beta (2)9(A6)Ser \rightarrow Cys$] in a Brazilian female. Hemoglobin. 1994; 18:235-9.

GRIGNOLI CR, WENNING MR, SONATI MF, KIMURA EM, ARRUDA VR, SAAD ST, COSTA FF. Hb Rio Claro [$\beta 34(B16)Val \rightarrow Met$]: a novel electrophoretically silent variant found in association with Hb Hasharon [$\alpha 47(CE5)Asp \rightarrow His$] and α -thalassemia-2(- $\alpha 3.7$). Hemoglobin. 2002; 26:405

HARANO T, HARANO K, KUSHIDA Y, UEDA S, YOSHII A, NISHINARITA M. Hb Isehara (or Hb Redondo) [$\beta 92 (F8) His \rightarrow Asn$]: an unstable variant with a proximal histidine substitution at the heme contact. Hemoglobin. 1991;15(4):279-90.

HARDISON R. The evolution of hemoglobin. Am Sci. 1999; 87: 126.

HILL AV. The possible effects of the aggregation of the molecules of haemoglobin on its dissociation curves. J Physiol. 1910; 40: 4-7.

HOFFBRAND AV, PETTIT JE, MOSS PAH. Essential Haematology. 4.ed, London, Edinburgh, Boston: Blackwell Science, 2000.p.437.

HORTON RH, MORAN LA, OCHS RS, RAWN DJ, SCRIMGEOUR KG. Principles of Biochemistry. 3rd ed. New Jersey: Prentice Hall, 1996. p801.

IMAI K, TIENTADAKUL P, OPARTKIATTIKUL N, LUENEE P, WINICHAGOON P, SVASTI J, FUCHAROEN S. Detection of haemoglobin variants and inference of their functional properties using complete oxygen dissociation curve measurements. Br J Haematol. 2001; 112:483-7.

KIMURA EM, JORGE SB, OGO SH, CESQUINI M, ALBUQUERQUE DM, FATTORI A, SAAD ST, COSTA FF, SONATI MF. A novel beta-globin variant: Hb Poços de Caldas [beta 61(E5)Lys→Gln]. Hemoglobin. 2002; 26: 385-8.

KIMURA EM, OLIVEIRA DM, JORGE SEDC, ABREU CF, ALBUQUERQUE DM, COSTA FF, SONATI MF. Identification of characterization of novel and rare variants of human hemoglobin. Rev. Bras. Hematol. Hemoter. 2008; 30:316-319.

KOSHLAND DE JR, NÉMETHY G, FILMER D. Comparison of experimental binding data and theoretical models in proteins containing subunits. Biochemistry. 1966; 5:365-85.

LABERGEAND M, YONETANI T. Molecular Dynamics Simulations of Hemoglobin A in Different States and Bound to DPG: Effector-Linked Perturbation of Tertiary Conformations and HbA Concerted Dynamics. *Biophys J.* 2008; 94: 2737

MCCAMMON J, GELIN JB, KARPLUS M. Dynamics of folded proteins. *Nature.* 1977; 267: 585–590.

MONOD J, WYMAN J, CHANGEUX JP. On The Nature Of Allosteric Transitions: A Plausible Model. *J Mol Biol.* 1965;12:88-118.

MOUAWAD L, PERAHIA D, ROBERT CH, GUILBERT C. New insights into the allosteric mechanism of human hemoglobin from molecular dynamics simulations. *Biophys J.* 2002; 82: 3224–3245.

NAGEL RL. Disorders of Hemoglobin Function and Stability. In: Steinberg MH, Forget BG, Higgs DR, Nagel RL. *Disorders of Hemoglobin - Genetics, Pathophysiology and Clinical Management.* Cambridge University Press: Ed. USA, 2001. p.1155-1194.

NISHIKURA K, SUGITA Y, NAGAI M, YONEYAMA Y. Ethylisocyanide equilibria of hemoglobins M Iwate, M Boston, M Hyde Park, M Saskatoon, and M Milwaukee-I in half-ferric and fully reduced states. *J Biol Chem.* 1975; 250:6679-85.

OLIVIERI O, VITOUX D, GALACTEROS F, BACHIR D, BLOUQUIT Y, BEUZARD Y, BRUGNARA C. Hemoglobin variants and activity of the (K+Cl-) cotransport system in human erythrocytes. *Blood*. 1992;79:793-7.

PERUTZ M. Hoppe-Seyler, Stokes and haemoglobin. *Biol Chem Hoppe Seyler*. 1995;376:449-50.

PERUTZ MF. Relation between structure and sequence of haemoglobin. *Nature*. 1962;194:914-7.

PERUTZ MF. Stereochemistry of Cooperative Effects in Haemoglobin: Haem-Haem Interaction and the Problem of Allostery. *Nature* 1970; 228:726-734

PERUTZ MF. Regulation of oxygen affinity of hemoglobin: influence of structure of the globin on the heme iron. *Annu Rev Biochem*. 1979; 48:327-86.

PERUTZ MF, BOLTON W, DIAMOND R, MUIRHEAD H, WATSON HC. Structure Of Haemoglobin. An X-Ray Examination Of Reduced Horse Haemoglobin. *Nature*, 1964; 203:687-90.

PERUTZ MF, SHIH DT, WILLIAMSON D. The chloride effect in human haemoglobin. A new kind of allosteric mechanism. *J Mol Biol*. 1994;239:555-60

PERUTZ MF, WILKINSON AJ, PAOLI M, DODSON GG. The stereochemical mechanism of the cooperative effects in hemoglobin revisited. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* 1998; 27:1-34.

PINDER AG, ROGERS SC, MORRIS K, JAMES PE. Haemoglobin saturation controls the red blood cell mediated hypoxic vasorelaxation. *Adv Exp Med Biol.* 2009;645:13-20.

PRIBILLA W, KLESSE P, BETKE K, LEHMANN H, BEALE D. Hemoglobin Köln disease: familial hypochromic hemolytic anemia with hemoglobin anomaly. *Klin Wochenschr.* 1965; 43: 1049-53.

RIGGS AF. The Bohr effect. *Annu Rev Physiol.* 1988;50:181-204

RONDA L, BRUNO S, ABBRUZZETTI S, VIAPPIANI C, BETTATI S. Ligand reactivity and allosteric regulation of hemoglobin-based oxygen carriers. *Biochim Biophys Acta.* 2008;1784:1365-77.

ROSSI-FANELLI A, ANTONINI E. Studies on the oxygen and carbon monoxide equilibria of human myoglobin. (1958) *Arch Biochem Biophys*; 77:478-492.

SCHROEDER WA, SHELTON JB, SHELTON JR, POWARS D. Hemoglobin Sunshine Seth - alpha 2 (94 (G1) Asp replaced by His) beta 2. *Hemoglobin.* 1979; 3:145-59.

SCHWARTZ H AND SPAET TH. Hemoglobin G: a fifth abnormal hemoglobin. *Clin. Res. Proc.* 1955; 3: 51.

SHIKAMA K. Nature of the FeO₂ bonding in myoglobin and hemoglobin: A new molecular paradigm. *Prog Biophys Mol Biol.* 2006;91:83-162.

SHIKAMA K, MATSUOKA A. Human haemoglobin: a new paradigm for oxygen binding involving two types of $\alpha\beta$ contacts. *Eur J Biochem.* 2003;270:4041-51

SMITH FR, LATTMAN EE, CARTER CW JR. The mutation beta 99 Asp-Tyr stabilizes Y--a new, composite quaternary state of human hemoglobin.. *Proteins.* 1991;10(2):81-91.

SONATI MF, KIMURA EM, ABREU CF, OLIVEIRA DM, PINHEIRO VR, COSTA FF. Hemoglobin Hammersmith [β 42 (CD1) Phe $\rightarrow$ Ser] in a Brazilian girl with congenital Heinz body hemolytic anemia. *Pediatr Blood Cancer.* 2006;47: 855-6.

STEINBERG MH, FORGET BG, HIGGS DR, NAGEL RL. Disorders of Hemoglobin - Genetics, Pathophysiology and Clinical Management. Cambridge University Press: Ed. USA, 2001.p.603.

STRYER L. Bioquímica. . 4ed., Rio de Janeiro, Guanabara Koogan,1996. p.139-170.

STUART MJ, NAGEL RL. Sickle-cell disease. Lancet. 2004;364:1343-60.

TAMAGNINI GP, RIBEIRO ML, VALENTE V, RAMACHANDRAN M, WILSON JB, BAYSAL E, GU LH, HUISMAN TH. Hb Coimbra or alpha 2 beta (2)99(G1)Asp→Glu, a newly discovered highoxygen affinity variant. Hemoglobin. 1991;15:487-96.

UYUKLU M, MEISELMAN HJ, BASKURT OK. Role of hemoglobin oxygenation in the modulation of red blood cell mechanical properties by nitric oxide. Nitric Oxide. 2009.Epub ahead of print

VETTORE L, DE SANDRE G, DI IORIO EE, WINTERHALTER KH, LANG A, LEHMANN H. A new abnormal hemoglobin O Padova, alpha 30 (B11) Glu -- Lys, and a dyserythropoietic anemia with erythroblastic multinuclearity coexisting in the same patient. Blood. 1974; 44:869-77

VOET D, VOET JC. Biochemistry. 4.ed. Toronto: John Wiley e Sons, 2004. p.215-250.

WAJCMAN H, BARDAKDJIAN-MICHAU J, RIOU J, PRÉHU C, KISTER J, BAUDIN-CREUZA V, PROMÉ D, RICHELME-DAVID S, HAROUSSEAU JL, GALACTÉROS F. Two new hemoglobin variants with increased oxygen affinity: Hb Nantes

[beta34(B16)Val→Leu] and Hb Vexin [beta116(G18)His→Leu]. Hemoglobin. 2003; 27:191-9.

WAJCMAN H, KIGER L, MARDEN MC. Structure and function evolution in the superfamily of globins. C R Biol. 2009; 332:273-82.

WAJCMAN H, VASSEUR C, BLOUQUIT Y, SANTO DE, PERES MJ, MARTINS MC, POYART C, GALACTEROS F. Hemoglobin Redondo [beta 92(F8) His----Asn]: an unstable hemoglobin variant associated with heme loss which occurs in two forms. Am J Hematol. 1991; 38:194-200.

WEATHERALL DJ, CLEGG JB. The Thalassemia Syndromes. Oxford: Ed. Blackwell Science, 2001.p.374.

Web Site of the Protein Data Bank.

<http://www.rcsb.org>

Web Site of the Wikipedia.

<http://www.wikipedia.org>

WEINSTEIN BI, ERRAMOUSPE B, ALBUQUERQUE DM, OLIVEIRA DM, KIMURA EM, COSTA FF, SONATI MF. Hb Florida: a novel elongated C-terminal beta-globin variant causing dominant beta-thalassemia phenotype. *Am J Hematol.* 2006; 81: 358-60.

WENNING MR, KIMURA EM, JORGE SB, COSTA FF, SONATI MF. Molecular characterization of hemoglobins Kurosaki [$\alpha 7$ Lys $\rightarrow$ Glu], G-Pest [$\alpha 74$ Asp $\rightarrow$ Asn], Stanleyville-II [$\alpha 78$ Asn $\rightarrow$ Lys] and J-Rovigo [$\alpha 53$ Ala $\rightarrow$ Asp]. *Acta Haematol.* 1999;102: 203-5.

WENNING MR, SILVA NM, JORGE SB, KIMURA EM, COSTA FF, TORSONI, OGO SH, SONATI MF. Hb Campinas [$\alpha 26(B7)$ Ala $\rightarrow$ Val]: a novel, electrophoretically silent, variant. *Hemoglobin.* 2000; 24: 143-8.

WILLIAMS WJ, BEUTLER E, ERLEV AJ, LICHTMAN MA. *Hematology*, 6.ed.; New York: Mc Graw Hill Book Company, 2001.p.1480.

WOOD KC, GRANGER DN. Sick cell disease: role of reactive oxygen and nitrogen metabolites. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2007;34:926-32

YOKOYAMA T, CHONG K T, MIYAZAKI G, MORIMOTO H, SHIH DTB, UNZAI S, TAME JRH, PARK, S-Y. Novel Mechanisms of pH Sensitivity in Tuna Hemoglobin: A Structural Explanation Of The Root Effect. J. Biol. Chem. 2004. 279: 28632–28640.

YONETANI T, LABERGE M. Protein dynamics explain the allosteric behaviors of hemoglobin. Biochim Biophys Acta. 2008; 1784:1146-58.

Hemoglobin, 31 (2):151–157, (2007)
 Copyright © Informa Healthcare
 ISSN: 0368-0269 print/1532-432X online
 DOI: 10.1080/03680260701289425

informa
 healthcare

SHORT COMMUNICATION

THREE NEW α -GLOBIN VARIANTS: Hb ITAPIRA [$\alpha 30(\text{B}11)\text{Glu} \rightarrow \text{Val}$ ($\alpha 1$)], Hb BOM JESUS DA LAPA [$\alpha 30(\text{B}11)\text{Glu} \rightarrow \text{Ala}$ ($\alpha 1$)] AND Hb BOA ESPERANÇA [$\alpha 16(\text{A}14)\text{Lys} \rightarrow \text{Thr}$ ($\alpha 2$)]

Susan E. Costa Jorge,¹ Elza M. Kimura,¹ Denise M. Oliveira,¹
 Satie Ogo,² Dulcinéia M. Albuquerque,³ Fernando F. Costa,³ and
 Maria de Fátima Sonati¹

¹Laboratory of Hemoglobinopathies, Department of Clinical Pathology, School of Medical Sciences, State University of Campinas-UNICAMP, Campinas, State of São Paulo, Brazil

²Department of Biochemistry, Institute of Biological Sciences, State University of Campinas-UNICAMP, Campinas, State of São Paulo, Brazil

³Hematology and Hemotherapy Center, UNICAMP, Campinas, State of São Paulo, Brazil

□ Three novel α -globin variants were found during a screening program for hemoglobinopathies in blood donors at the UNICAMP Hematology and Hemotherapy Center, Campinas, State of São Paulo, Southeastern Brazil. They were named for the town of origin of the carrier as Hb Itapira [$\alpha 30(\text{B}11)\text{Glu} \rightarrow \text{Val}$], Hb Bom Jesus da Lapa [$\alpha 30(\text{B}11)\text{Glu} \rightarrow \text{Ala}$] and Hb Boa Esperança [$\alpha 16(\text{A}14)\text{Lys} \rightarrow \text{Thr}$]. Hb Itapira, like Hb Bom Jesus da Lapa, shows an electrophoretic mobility similar to that of Hb S [$\beta 6(\text{A}3)\text{Glu} \rightarrow \text{Val}$, GAG $\rightarrow$ GTG] at alkaline pH; it is associated with a triplicate α -globin allele ($\alpha\alpha^{\text{anti } 3.7}$) and corresponds to only 5.5% of the total hemoglobin (Hb). Hb Boa Esperança, found in two different individuals, moves faster than Hb A and exhibits an abnormal functional performance.

Keywords Hereditary hemoglobinopathies, α -Globin variants, Hb Itapira, Hb Bom Jesus da Lapa, Hb Boa Esperança, Brazilian population

Among the more than 900 hemoglobin (Hb) variants described to date, about 300 result from mutations in the α -globin genes. Although some variants are related to important clinical and hematological manifestations,

Received 16 August 2006, accepted 9 October 2006.

Address correspondence to Dr. Maria de Fátima Sonati, Department of Clinical Pathology, School of Medical Sciences, State University of Campinas-UNICAMP, P.O.Box 6111, 13083-970 Campinas, State of São Paulo, Brazil; Tel.: +55-19-3521-9451; Fax: +55-19-3521-9434; E-mail: sonati@fcm.unicamp.br; sonati_mf@yahoo.com.br

most are asymptomatic (1). We report the detection of three new variants with altered α chains during a screening program for hemoglobinopathies in blood donors at the UNICAMP Hematology and Hemotherapy Center, Campinas, State of São Paulo, Southeastern Brazil. They were named for the town of origin of the carrier as Hb Itapira [$\alpha 30(\text{B}11)\text{Glu}\rightarrow\text{Val}$], Hb Bom Jesus da Lapa [$\alpha 30(\text{B}11)\text{Glu}\rightarrow\text{Ala}$] and Hb Boa Esperança [$\alpha 16(\text{A}14)\text{Lys}\rightarrow\text{Thr}$]. The screening program for hemoglobinopathies in blood donors had the approval of the local Ethics Committee and all individuals analyzed here gave their written consent for the Hb and DNA analyses.

Hb Itapira [$\alpha 30(\text{B}11)\text{Glu}\rightarrow\text{Val}$] was found in a 25-year-old Caucasian Brazilian male of Italian and Portuguese descent. Cellulose acetate electrophoresis at alkaline pH (2) showed, in addition to Hb A and Hb A₂ bands, an Hb S-like band in the proportion of 5.5% that eluted as a short peak in the D window on cation exchange high performance liquid chromatography (HPLC) (VARIANT II™, β -Thalassemia Short Program; Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) (Figure 1A). Acidic Hb electrophoresis (2) did not show any abnormality. Globin chain electrophoresis at acid pH (2) revealed an extra band present in a low proportion that had a slower mobility than normal α chains. Hemolysate solubility and stability tests were normal.

Direct sequencing (ABI PRISM™ 377 DNA Automated Sequencer, Applied BioSystems, Foster City, CA, USA) of the α -globin genes (3) showed a heterozygous GAG $\rightarrow$ GTC transversion at codon 30 of the $\alpha 1$ -globin gene which leads to Glu $\rightarrow$ Val substitution in the corresponding position of the α chain (Figure 2A). Heterozygosity for the $\alpha\alpha^{\text{anti-3.7}}$ allele was also detected (4). A familial study showed that the mother and one of the brothers of the carrier had the same mutation as well as the $\alpha\alpha^{\text{anti3.7}}$ triplication, suggesting an association that could explain the low levels of the variant in the hemolysate. Hematological and molecular data for this family and for the cases described below are summarized in Table 1.

Hb Bom Jesus da Lapa [$\alpha 30(\text{B}11)\text{Glu}\rightarrow\text{Ala}$] was found in a 37-year-old female of African descent, coming from the northeast region of Brazil. The electrophoretic behavior of this Hb was similar to that of Hb Itapira, and it had the same retention time as Hb A₂ on HPLC and corresponded to 24.8% of the total Hb (Figure 1B). Acidic Hb electrophoresis and globin chain electrophoresis did not show any abnormal fractions. Solubility and stability tests were normal. Functional tests were carried out with total hemolysate according to the method of Rossi-Fanelli and Antonini (5) using Hb stripped by filtration through a Sephadex G-25 column. Experiments performed in the lysate, both in the absence and presence of organic phosphate [inositol hexaphosphoric acid (IHP)] (6,7) showed normal oxygen binding properties.

Molecular analysis revealed a heterozygosity for the GAG $\rightarrow$ GCG transversion in the same gene and position as that of Hb Itapira, *i.e.*, $\alpha 1$, codon 30. However, in this case, the mutation caused a Glu $\rightarrow$ Ala substitution in the

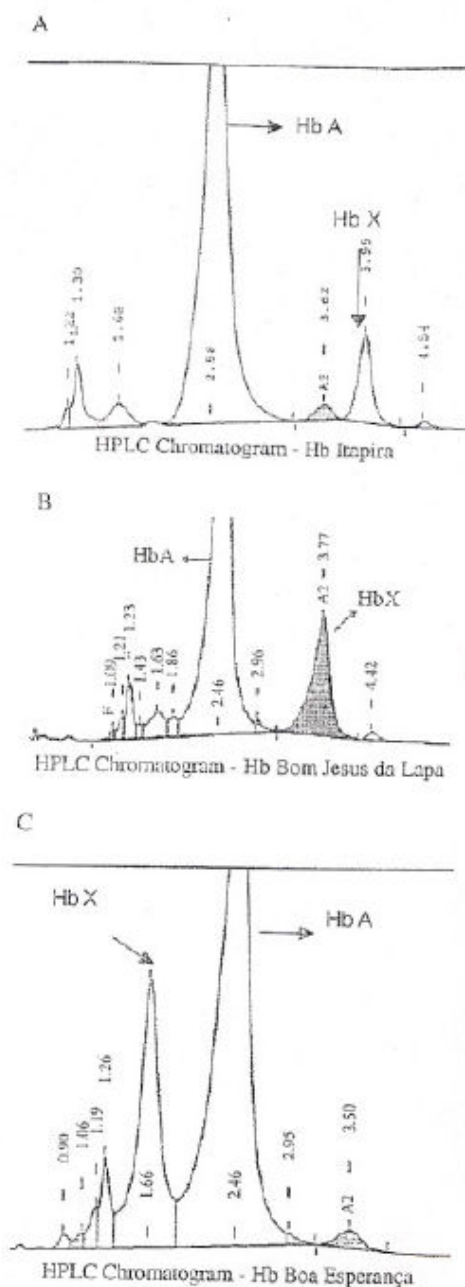


FIGURE 1 High performance liquid chromatograms. A) Hb Itapira [$\alpha 30(\text{B}11)\text{Glu}\rightarrow\text{Val}$] 5.5%; B) Hb Bom Jesus da Lapa [$\alpha 30(\text{B}11)\text{Glu}\rightarrow\text{Ala}$] 24.8%; C) Hb Boa Esperança [$\alpha 16(\text{A}14)\text{Lys}\rightarrow\text{Thr}$] 24.8%.

corresponding position of the α chain (Figure 2B). The α genotype was normal ($\alpha\alpha/\alpha\alpha$) (8).

Hb Boa Esperança [$\alpha 16(\text{A}14)\text{Lys}\rightarrow\text{Thr}$] was detected independently in two apparently unrelated individuals: a 47-year-old Caucasian female and a

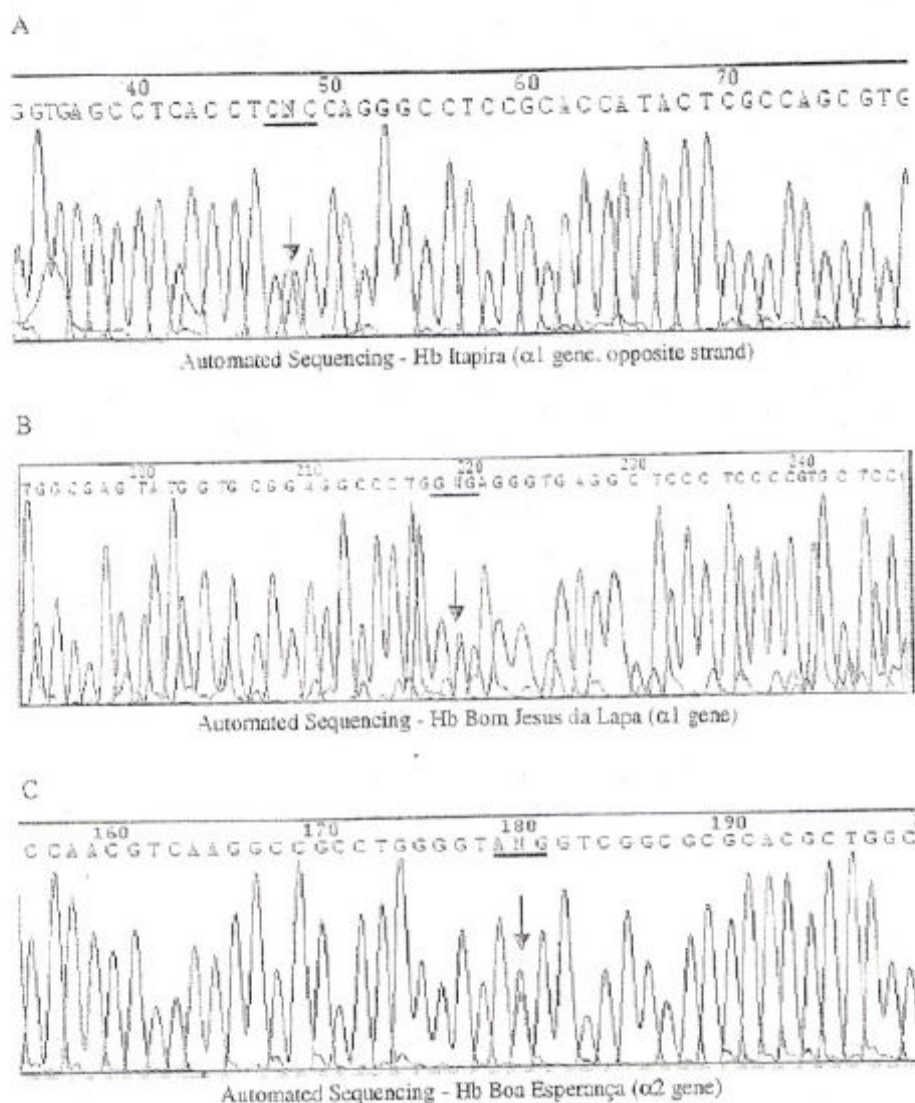


FIGURE 2 α -Globin gene sequencing. A) Hb Itapira ($\alpha 1$ gene, opposite strand); B) Hb Bom Jesus da Lapa ($\alpha 1$ gene); C) Hb Boa Esperança ($\alpha 2$ gene).

32-year-old male of African descent. On alkaline electrophoresis, this abnormal Hb migrated faster than Hb A but could not be distinguished from Hb A at acid pH. On HPLC, Hb Boa Esperança eluted as an additional peak at P3 in the proportion of 25% of the total Hb (Figure 1C). Acidic globin chain electrophoresis showed a slower α chain as well as the normal chains. Solubility and stability tests were normal.

When stripped, this Hb revealed a lower oxygen affinity, while the opposite behavior was observed in the presence of IHP (Figure 3). Cooperativity was slightly lower at acidic pH in both conditions, with and without organic phosphates.

TABLE 1 Hematological and Molecular Data for Carriers of the Hb Itapira, Hb Bom Jesus da Lapa and Hb Boa Esperança Mutations

Hb Name Parameters	Itapira ($\alpha 30$ Glu $\rightarrow$ Val)	Itapira ($\alpha 30$ Glu $\rightarrow$ Val)	Bom Jesus da Lapa ($\alpha 30$ Glu $\rightarrow$ Ala)	Boa Esperança ^a ($\alpha 16$ Lys $\rightarrow$ Thr)	Boa Esperança ^a ($\alpha 16$ Lys $\rightarrow$ Thr)
Sex-Age	M-25	M-37	F-37	F-37	M-32
RBC ($10^{12}/L$)	4.97	5.05	4.78	4.51	4.95
Hb (g/dL)	15.3	15.3	15.0	13.8	15.3
PCV (L/L)	0.46	0.47	0.43	0.42	0.46
MCV (fL)	91.8	90.8	90.4	93.6	99.9
MCH (pg)	30.8	30.5	31.4	30.6	30.9
RDW (%)	19.3	19.0	13.1	13.6	12.2
Reticulocytes (%)	1.31	1.43	0.95	1.33	1.80
Electrophoresis (pH 8.9)	$A_2 + X + A$ $\beta + \alpha^N + \alpha$	$A_2 + X + A$ $\beta + \alpha^N + \alpha$	$A_2 + X + A$ $\beta + \alpha$	$A_2 + A_2' + A + X$ $\beta + \alpha^N + \alpha$	$A_2 + A_2' + A + X$ $\beta + \alpha^N + \alpha$
Globin chain electrophoresis					
Hb A ₂ (%)	2.0	1.4	3.1	2.1	2.0
Hb F (%)	<2.0	0.3	0.6	0.5	1.7
Hb X (%)	5.5	10.0	24.8	24.8	25.1
Solubility test	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
Stability test	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
Mutation	Codon 90 ($\alpha 1$), GAG $\rightarrow$ GTC $\alpha\alpha/\alpha\alpha^{mut3.7}$	Codon 90 ($\alpha 1$), GAG $\rightarrow$ GTC $\alpha\alpha/\alpha\alpha^{mut3.7}$	Codon 30 ($\alpha 1$), GAG $\rightarrow$ GCG $\alpha\alpha/\alpha\alpha$	Codon 16 ($\alpha 2$), AAG $\rightarrow$ ACG $\alpha\alpha/\alpha\alpha$	Codon 16 ($\alpha 2$), AAG $\rightarrow$ ACG $\alpha\alpha/\alpha\alpha$
α Genotype					

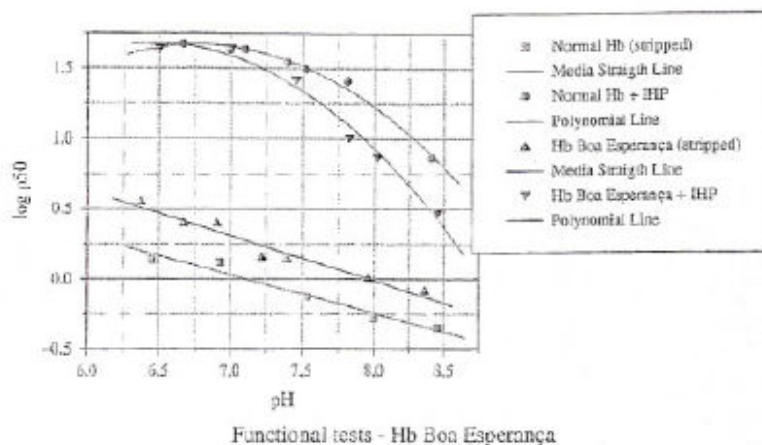


FIGURE 3 Functional performance of Hb Boa Esperança.

Hb Boa Esperança was found to be the result of an AAG→ACG transversion at codon 16 of the $\alpha 2$ gene, leading to a Lys→Thr substitution (Figure 2C). The mutation was present in the heterozygous state. The α genotype was normal ($\alpha\alpha/\alpha\alpha$) in both carriers. As with Hbs Itapira and Bom Jesus da Lapa, two other variants in which the glutamic acid residue at $\alpha 30$ (B11) was replaced have been previously reported, namely, Hb O-Padova (→Lys), found in Italian, Turkish and Spanish families, and Hb G-Chinese (→Gln), in Chinese families (1). Neither of them resulted in clinical or hematological manifestations, although this residue is involved in the $\alpha 1\beta 1$ contacts of the Hb molecule (9). The absence of manifestations may be because the $\alpha 1\beta 1$ interface is stabilized by Van der Waals interactions among 18 other residues (9). Therefore, the substitutions were insufficient to destabilize the molecule structure.

Regarding the low levels of Hb Itapira found in the hemolysates of the carriers, to the best of our knowledge, this is the first description of a structural alteration associated with the triplicated α gene allele in humans. However, it has been demonstrated in sheep that the expression of the genes in the $\alpha\alpha\alpha$ haplotype progressively decreased from the 5' to the 3' end, as determined at both protein and mRNA levels (10,11). If this model is true also for humans, as the $\alpha 1$ gene occupies the third position in the triplicated allele, a low degree of expression would be expected. It seems to be the case here, since there is no evidence of Hb instability and hemolysis in the carriers. They are totally asymptomatic and the haptoglobin and bilirubin serum levels, as well as the reticulocyte counts, are normal.

Three other mutations have already been described at position 16 of the α -globin chain: Hb I (Lys→Gln) and Hb Beijing (Lys→Asn) in asymptomatic heterozygotes, and Hb Harbin (Lys→Met), which is slightly unstable and results in anemia in the carrier (1). In Hb Boa Esperança, lysine is

replaced by threonine; although the carriers did not present any clinical symptoms, altered functional behavior was observed *in vitro*. The hydrocarbon group of the lysine residue at the A14 α position is extended and rigid, unlike most of the lysine residues in the Hb molecule, which are flexible. Replacement of this residue by a threonine probably interferes with the α chain stabilization and the polar and non polar contacts with aspartic acid at GH4 α , which may have led to the abnormal functional test (9). In a future study, we intend to isolate and better characterize this Hb variant.

ACKNOWLEDGMENTS

Part of this study was presented as an abstract at the 46th American Society of Hematology Meeting held in San Diego, CA, USA in 2004 [Blood 104(11), abstract 3739]. We thank Mr. Colin and Mrs. Luiza Bowles for the English revision of this manuscript. Financial support by Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (grants 02/13801-7 and 04/06288-7), and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brazil.

REFERENCES

1. Hardison RC, Chui DHK, Giardine B, Riemer C, Patrinos GP, Anagnou N, Miller W, Wajcman H. HbVar: a relational database of human hemoglobin variants and thalassemia mutations at the globin gene server. *Hum Mutat* 2002; 19(3):225-233 (<http://globin.csc.psu.edu>).
2. Dacie JV, Lewis SM. *Practical Haematology*, 8th ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1995.
3. Dodé C, Rochette J, Krishnamoorthy R. Locus assignment of human α globin mutations by selective amplification and direct sequencing. *Br J Haematol* 1990; 76(2):275-281.
4. Dodé C, Krishnamoorthy R, Lamb J, Rochette J. Rapid analysis of $-\alpha^{3.7}$ thalassaemia and $\alpha\alpha\alpha^{ami 3.7}$ triplication by enzymatic amplification analysis. *Br J Haematol* 1993; 83(1):105-111.
5. Rossi-Fanelli A, Antonini E. Studies on the oxygen and carbon monoxide equilibria of human hemoglobin. *Arch Biochem Biophys* 1958; 77(2):478-492.
6. Chanutin A, Carnish RR. Effect of organic and inorganic phosphates on the oxygen equilibrium of human erythrocytes. *Arch Biochem Biophys* 1967; 121(1):96-102.
7. Benesch R, Benesch RE. The effect of organic phosphates from the human erythrocyte on the allosteric properties of hemoglobin. *Biochem Biophys Res Commun* 1967; 26(2):162-167.
8. Tan ASC, Quah TC, Low PS, Chong SS. A rapid and reliable 7-deletion multiplex polymerase chain reaction assay for α -thalassaemia. *Blood* 2001; 98(1):250-251.
9. Antonini E, Brunori M. *Hemoglobin and Myoglobin in Their Reaction with Ligands*, 1st ed. Amsterdam: North-Holland Publishing Company, 1970.
10. Vestri R, Pieragostini E, Yang F, di Gregorio P, Rando A, Masina P. Expression of triplicated and quadruplicated α globin genes in sheep. *Br J Haematol* 1991; 77(1):110-116.
11. Vestri R, Pieragostini E, Ristaldi MS. Expression gradient in sheep $\alpha\alpha$ and $\alpha\alpha\alpha$ globin gene haplotypes: mRNA levels. *Blood* 1994; 83(8):2317-2322.

CASE REPORT

Two new unstable haemoglobins leading to chronic haemolytic anaemia: Hb Caruaru [β 122 (GH5) Phe $\rightarrow$ Ser], a probable case of germ line mutation, and Hb Olinda [β 22 (B4) - 25 (B7)], a deletion of a 12 base-pair sequence

Marcos A. C. Bezerra^{1,2}, Dulcinéia M. Albuquerque², Magnun N. N. Santos^{1,3}, Elza M. Kimura³, Susan E. D. C. Jorge³, Denise M. Oliveira³, Betânia L. T. B. Domingues¹, Jaqueline C. Peres¹, Aderson S. Araújo¹, Fernando F. Costa², Maria F. Sonati³

¹Haematology and Haemotherapy Centre of Pernambuco-HEMOPE, Recife, Pernambuco, Brazil; ²Haematology and Haemotherapy Centre, State University of Campinas-UNICAMP, Campinas, São Paulo, Brazil; ³Department of Clinical Pathology, School of Medical Sciences, State University of Campinas-UNICAMP, Campinas, São Paulo, Brazil

Abstract

We describe here two new unstable β -globin variants, Hb Caruaru and Hb Olinda, found in northeastern Brazil, both associated with chronic haemolytic anaemia. Haemoglobin Caruaru is caused by a single base substitution at codon 122 (TTC $\rightarrow$ TCC), possibly originating from the germ line cells of the patient's grandmother. Haemoglobin Olinda is also a *de novo* mutation, caused by a 12 bp deletion leading to the removal of the 22nd to the 25th residues of the normal β -globin chain.

Key words haemoglobinopathies; haemolytic anaemia; unstable haemoglobins; beta-globin variants; thalassaemia intermedia; germ line mutation; *de novo* mutation

Correspondence Maria de Fátima Sonati, Department of Clinical Pathology, School of Medical Sciences, State University of Campinas-UNICAMP, Campinas, State of São Paulo, Brazil, PO Box 6111, Zip Code 13083-970. Tel: (55-19) 35219451; Fax: (55-19) 35219434; e-mail: sonati@fcm.unicamp.br

Accepted for publication 10 June 2009

doi:10.1111/j.1600-0609.2009.01296.x

Changes in the coding sequences of globin genes can alter function and/or stability of the haemoglobin molecule (Hb). Unstable haemoglobins arise as a result of the synthesis of structurally abnormal globin chains, usually with single amino acid replacements but occasionally with amino acid insertions, deletions, or truncated or extended chains, and commonly presenting as autosomal-dominant hereditary haemolytic anaemia with inclusion bodies in the red blood cells (1, 2). We herein describe two novel unstable β -globin variants, Hb Caruaru [β 122 Phe $\rightarrow$ Ser] and Hb Olinda [removal of the 22nd to 25th amino acids (-Glu-Val-Gly-Gly-) of the β -globin chain]. They were named according to the towns of origin of their respective carriers.

Case reports

Both variants were identified in individuals from the State of Pernambuco, northeastern Brazil. The

patients/guardians gave their written consent to take part in this study, which was approved by the local ethics committee.

Case 1

An 11-year-old Caucasian boy from the city of Caruaru presented with chronic haemolytic anaemia, jaundice, liver and spleen enlargement, and the occasional requirement for blood transfusions. Conventional haemoglobin electrophoresis and high performance liquid chromatography (HPLC) analysis (VARIANTTM, Bio-Rad Laboratories, CA, USA) did not reveal any abnormalities. Isoelectric focusing showed only Hb A and Hb F fractions, but the latter corresponded to a concentration of about 20%, suggesting comigration with the abnormal variant. Reverse phase-HPLC (RP-HPLC) (Alliance 2695, Waters, Milford, MA, USA) detected an anomalous β -chain eluting more quickly than β^A globin

(Fig. 1A). Instability tests/Heinz bodies were all positive (3); functional tests with total stripped haemolysate showed slightly increased O_2 affinity (with and without organic phosphates). The haeme-haeme cooperativity (without organic phosphates) demonstrated non-cooperativity between protein chains at alkaline pHs (> 7.50) in comparison with Hb A (4, 5).

Beta-globin gene sequencing was performed using primers described elsewhere (6), Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK) and a MegaBace 1000 DNA Analysis System (Molecular Dynamics, Amersham Pharmacia Biotech, Sunnyvale, CA, USA). Heterozygosity for the TTT $\rightarrow$ TCC transition at codon 122 was found (Fig. 1B), leading to the substitution of phenylalanine by serine in the corresponding position of the β -chain. This variant was named Hb Caruaru. Haematological, biochemical and familial data of the patient are shown in Table 1. All the Hb Caruaru carriers presented with hypochromic and microcytic haemolytic anaemia. These carriers included the patient's father and six out of his 12 siblings, as well as three of the patient's cousins (Fig. 1C). They all had normal α -globin genotypes and presence of the *Xmn* I polymorphism (7–11). The Hb

Caruaru mutation was found to be associated with the haplotype IX of Orkin (12). Although paternity and maternity were confirmed, no mutations were detected in the β -globin genes of the patient's grandparents, even when DNA was obtained from the spermatozoa of his grandfather, suggesting that the mutation responsible for Hb Caruaru originated in the germ line cells of the patient's grandmother.

Case 2

A 39-year-old White Brazilian woman of Portuguese ancestry, from the city of Olinda, presented with haemolytic anaemia, pallor, intense jaundice, hepatosplenomegaly and an occasional need for blood transfusions [RBC $3.48 \times 10^6/\text{mm}^3$, Hb 7.8 g/dL, Hct 26.6%, MCV 76.4 fL, MCH 22.4 pg, RET 647.3 ($\times 10^9/\text{mm}^3$); TB 5.2 mg/dL, IB 4.6 mg/dL, SH inferior to 7.3 mg/dL, SF 18.6 ng/mL and SI/TIBC 79.0 $\mu\text{g}/\text{dL}/421.0 \mu\text{g}/\text{dL}$]. Alkaline pH electrophoresis revealed a Hb S-like band with a concentration of approximately 7%, in addition to Hb A and A_2 ; the abnormal band apparently eluted with Hb A_2 by HPLC (10.5% in total), while Hb F constituted 1.5%.

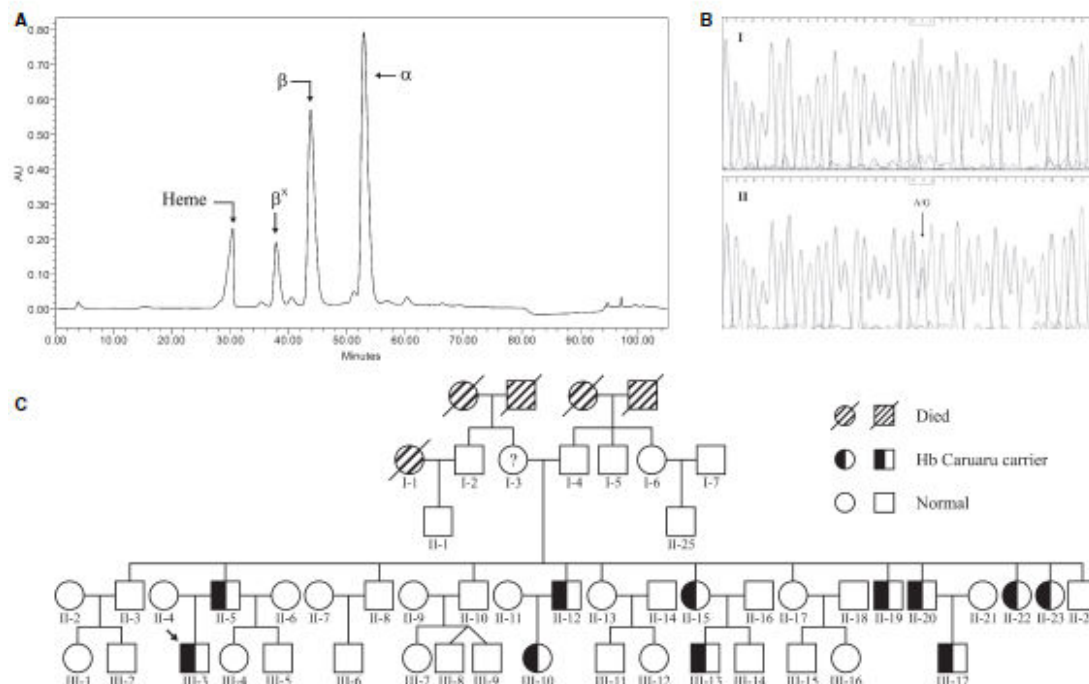


Figure 1 (A) RP-HPLC showing the abnormal β -globin (β^*) of Hb Caruaru ($\beta 122$ Phe $\rightarrow$ Ser). (B) β -globin gene sequencing – Hb Caruaru carrier. BI: Reverse strand normal sequence. BII: Reverse strand with the mutation at codon 122 (TTC $\rightarrow$ TCC). (C) Hb Caruaru family pedigree. Arrow indicates the proband.

Table 1 Haematological, biochemical and familial data of the Hb Caruaru ($\beta 122$ Phe $\rightarrow$ Ser) patient

Data	II-5	II-12	II-15	II-19	II-20	II-22	II-23	III-3	III-10	III-13	III-17
Age (years)	35	29	26	25	23	19	16	11	2	8	3
RBC ($10^6/\text{mm}^3$)	4.01	3.65	3.39	3.89	4.14	4.32	4.31	3.57	3.73	3.45	3.96
NV: 4.5–6.1 (M) 4.2–5.4 (F)											
Hb (g/dL)	9.9	8.5	8.1	9.5	10.5	10.1	9.2	8.2	8.4	8.2	8.9
NV: 14–18 (M) 12–16 (F)											
Hct (%)	31.8	27.8	26.2	32.7	33.2	34.7	31.6	27.1	28.4	28.5	29.3
NV: 42–52 (M) 37–47 (F)											
MCV (fL)	78.1	76.2	77.3	79.2	76.9	79.6	73.3	75.9	76.1	77.1	74.2
NV: 80–96 (M) 81–99 (F)											
MCH (pg)	23.7	23.3	23.9	23.2	23.1	24.0	21.3	23.0	22.5	23.8	22.5
NV: 27–32											
Ret ($10^6/\text{mm}^3$)	553.3	678.9	661.0	708.0	869.4	1144.8	771.5	714.0	615.4	476.1	537.2
NV: ≤ 100											
HbA ₂ (%)	4.1	4.0	4.2	4.4	4.2	4.1	4.2	4.1	4.1	4.6	4.3
NV: 2–3.5											
Hb F (%)	3.4	11.0	4.7	4.5	3.6	4.3	3.3	5.0	10.5	6.6	7.0
NV: 0–2											
IB (mg/dL)	3.94	5.35	3.03	3.44	5.03	2.67	1.50	3.84	3.24	3.10	3.14
NV: ≤ 0.8											
TB (mg/dL)	4.51	5.96	3.50	3.63	5.62	3.24	2.06	4.62	3.54	3.75	3.50
NV: ≤ 1.0											
SH (mg/dL)	10.6	19.5	<7.31	<7.31	7.88	<7.31	9.43	<7.31	12.8	8.75	13.0
NV: 30–230											
SF (ng/dL)	136.30	124.0	266.0	273.0	76.4	172.8	182.0	96.82	33.07	92.0	88.0
NV: 30–450 (M) 13–150 (F)											
SI ($\mu\text{g}/\text{dL}$)	133.0	91.0	108.0	75.0	149.0	115.0	65.0	60.0	74.0	87.0	121.0
NV: 59–158 (M) 37–145 (F)											
Xmn I	+/+	+/+	+/+	+/-	+/+	+/+	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-

RBC, red blood cells; Hb, haemoglobin; Hct, haematocrit; MCV, mean corpuscular volume; MCH, mean corpuscular haemoglobin; Ret, reticulocyte count; HbA₂, A₂ haemoglobin; Hb F, foetal haemoglobin; IB, indirect bilirubin; TB, total bilirubin; SH, serum haptoglobin; SF, serum ferritin; SI, serum iron; NV, normal values; M: males; F: females.

Isoelectric focusing showed two extra bands in addition to the normal bands, one close to the Hb S position (3.0%) and the other moving towards the Hb C position (about 4.0%), probably representing remaining degradation products of the unstable variant. No anomalous peak was detected by RP-HPLC. Functional tests with stripped total haemolysate showed lower O₂ affinity, when not using organic phosphates, and higher O₂ affinity only in alkaline pH (8.0 and 8.5) when using organic phosphates, compared with Hb A. Haeme-haeme cooperativity was normal.

Beta-globin gene sequencing showed a deletion of a 12-bp-sequence (-GAAGTTGGTGGT) in exon 1, removing codons 22–25 (Fig. 2A). This deletion was confirmed by cloning techniques using the pGEM-T easy vector (Promega, Madison, WI, USA). The patient also had a deletion of a T (-T) at position 26 (or 27 or 28) of intron II (IVS-II) in *cis* with the 12-bp-sequence deletion. With regard to the α -genes, the patient was heterozygous

for the *rightward* deletion ($-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$). Analysis of the β -globin *cluster* haplotype showed the pattern [- - - - + + -], corresponding to haplotype V of Orkin. The polymorphism C $\rightarrow$ T (Xmn I) at nucleotide -158, 5' to the α_2 globin gene was not present.

As biological paternity and maternity were confirmed and the patient's parents did not demonstrate any alteration in the β -globin genes, we conclude that Hb Olinda was caused by a *de novo* mutation. The patient's father and son have no haematological alterations (AA, $\alpha\alpha/\alpha\alpha$ and AA, $-\alpha/\alpha$, respectively), while her mother is heterozygous for Hb S (AS, $-\alpha/\alpha$). This familial study is shown in Fig. 2B.

Discussion

Hb Caruaru ($\beta 122$ Phe $\rightarrow$ Ser) is the result of the substitution of phenylalanine (located at GH5 position) by serine, in the β -chain. The hydrophobic native residue,

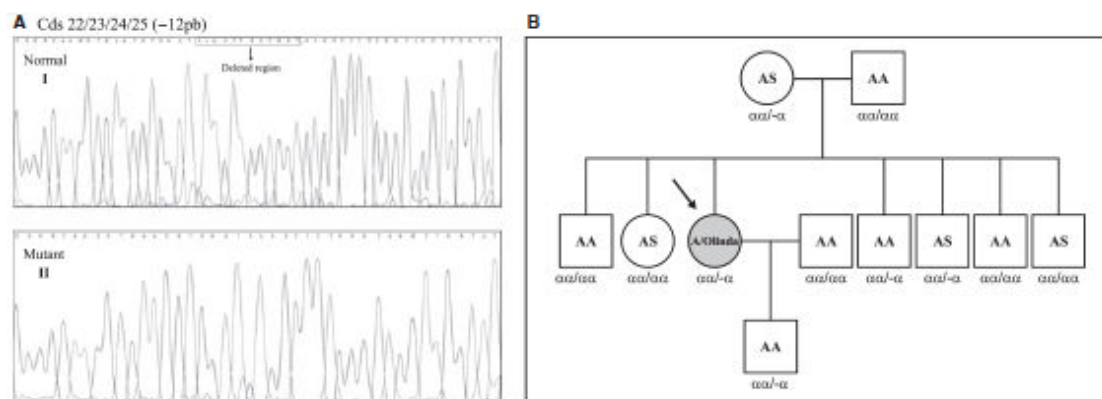


Figure 2 (A) β -globin gene sequencing (Hb Olinda carrier) AI: Normal strand (forward). AII: Strand with the deletion of codons 22–25 (–GAAGTTGGTGGT) in exon 1 (forward). (B) Hb Olinda [β (–cd 22–25)] family pedigree. Arrow indicates the proband.

phenylalanine, interacts with arginine 31 at helix B, in the α -chain. According to Nagel (13), alterations in the α 1- β 1 contacts, with major disruption of the overall conformation of Hb, may favour the R state (13). In agreement, Hb Caruaru also demonstrated higher affinity to O_2 . Moreover this residue demonstrates intense interactions with other hydrophilic residues in the same β -chain, forming an important hydrophobic set, which may be important for the stability of the molecule. The replacement of phenylalanine by serine, a polar residue, may promote the entrance of water, which could confer a lower stability to the tetramer structure of the protein.

As this replacement does not change the electric charge of the protein, Hb Caruaru is not distinguishable from normal haemoglobin by methods that compare just this property. Two previously described variants with substitutions at the same position [Hb Bushey (β 122 Phe $\rightarrow$ Leu) and Hb Casablanca (β 65 Lys $\rightarrow$ Met; β 122 Phe $\rightarrow$ Leu)] were not reported to be associated with haematological alterations (14), possibly because leucine, like phenylalanine, is a neutral and apolar residue and does not critically alter the tetrameric stability and function.

Haemoglobin Caruaru seems to have originated from the germ line cells of the patient's grandmother. To our knowledge, there is only one previously reported case of germ line mosaicism that affects globin genes. Haemoglobin Puntelange [β 140 Ala $\rightarrow$ Val] was found as a *de novo* mutation in two French siblings suffering from polycythemia, of which both parents were phenotypically normal and had no detectable alterations in the β -genes (15). In this case, the mutation seemed to have arisen in the germ line cells of the father of the patients.

Hb Olinda is composed of a shorter and very unstable β -globin as a result of a 12 bp deletion in exon 1 of the

β -globin gene (–GAAGTTGGTGGT), leading to the removal of codons 22–25 and, consequently, the respective amino acids (–Glu–Val–Gly–Gly). In addition to changes in the whole protein structure, the above sequence is replaced by Glu–Ala–Leu–Gly. While the 22nd and the 25th positions are external, the 23rd and 24th residues (Ala–Leu) are inside the Hb molecule. Substitutions at these positions, particularly in the 24th residue, in close contact with the E helix, lead to the production of variants with altered stability and function and haemolytic anaemia (16).

Only 19 of 106 unstable β -globin variants are caused by small deletions and just one, Hb Freiburg [β 23 (B5) – removing codon 23], has been reported to affect the same region that is altered in Hb Olinda. This alteration causes mild haemolytic anaemia and cyanosis (16). Two other deletions involving this same region result in a β -thalassaemia phenotype; a deletion of 7 bp (–AAGTTGG), affecting codons 22–24 of the β -gene and creating a new stop signal at codon 58, was described in a Turkish patient (17), and a 4 bp deletion in codons 20/21 (–TGGA) was found in a Spanish patient (18). In the Hb Olinda carrier, the low concentration of the abnormal haemoglobin in the peripheral red blood cells (7%) suggests that this is an extremely unstable haemoglobin variant, which may be also precipitating in the bone marrow precursor cells and leading to some degree of ineffective erythropoiesis, explaining the dominant β -thalassaemia phenotype.

In summary, we herein describe two new unstable β -globin variants, Hb Caruaru and Hb Olinda. Both are associated with chronic haemolytic anaemia. Haemoglobin Caruaru is caused by a single base substitution at codon 122 (TTC $\rightarrow$ TCC), possibly originating from the germ line cells of the patient's grandmother. Haemoglobin Olinda is also a *de novo* mutation, caused by a 12 bp



Research Article

Hb H disease resulting from the association of an α^0 -thalassemia allele $[-(\alpha)^{20.5}]$ with an unstable α -globin variant [Hb Icaria]: First report on the occurrence in Brazil

Elza M. Kimura¹, Denise M. Oliveira¹, Kleber Fertrin^{2,3}, Valéria R. Pinheiro³, Susan E.D.C. Jorge¹, Fernando F. Costa² and Maria de Fátima Sonati¹

¹*Departamento de Patologia Clínica, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brazil.*

²*Centro de Hematologia e Hemoterapia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brazil.*

³*Centro Infantil Dr. Domingos A. Boldrini, Campinas, SP, Brazil.*

Abstract

Hb H Disease is caused by the loss or inactivation of three of the four functional α -globin genes. Patients present chronic hemolytic anemia and splenomegaly. In some cases, occasional blood transfusions are required. Deletions are the main cause of this type of thalassemia (α -thalassemia). We describe here an unusual case of Hb H disease caused by the combination of a common α^0 deletion $[-(\alpha)^{20.5}]$ with a rare point mutation (c.427T > A), thus resulting in an elongated and unstable α -globin variant, Hb Icaria, (X142K), with 31 additional amino-acid residues. Very high levels of Hb H and Hb Bart's were detected in the patient's red blood cells (14.7 and 19.0%, respectively). This is the first description of this infrequent association in the Brazilian population.

Key words: hereditary hemoglobinopathies, alpha-thalassemia, Hb H disease, Hb Icaria.

Received: December 10, 2008; Accepted: May 21, 2009.

The alpha (α)-globin genes are duplicated (α_2 and α_1) and located on the short arm of chromosome 16 (16p13.3). Alpha-thalassemia (α -thal) is a hereditary condition resulting from deficient synthesis of α -globin chains. It has a worldwide distribution and reaches frequencies as high as 80% or more in some populations, reflecting positive selection after exposure to malaria (Higgs and Weatherall, 2009). Deletions resulting from unequal crossing-over between homologous sequences in the α -gene cluster are the main cause of this hemoglobinopathy and may affect one or both α genes in the haploid genome (α^+ or α^0 alleles, respectively). Nondeletional mutations are less frequent and usually correspond to more pronounced hematological alterations (Steinberg *et al.*, 2001; Weatherall and Clegg, 2001).

The combination of an α^0 allele with an α^+ allele, affecting three of the four functional α genes, leads to Hb H disease ($-\alpha$), a moderate to severe chronic hemolytic anemia with the presence of 5%-25% of Hb H (β_4) in pe-

ripheral blood erythrocytes (Steinberg *et al.*, 2001; Weatherall and Clegg, 2001). Hb H is unstable and precipitates in all circulating cells when submitted to any oxidant stress. Herein, we describe a rare case of Hb H disease resulting from the association of the $[-(\alpha)^{20.5}]$ deletion, an α^0 deletion commonly found in Mediterranean and Central Asian populations, with a point mutation (c.427T > A), this leading to the synthesis of an elongated and unstable α -globin variant, Hb Icaria [(X142K) modified C-terminal sequence: (142)Lys-Ala-Gly-Ala-Ser-Val-Ala-Val-Pro-Pro-Ala-Arg-Trp-Ala-Ser-Gln-Arg-Ala-Leu-Leu-Pro-Ser-Leu-His-Arg-Pro-Phe-Leu-Val-Phe-(172)Glu-COOH]. Hemoglobin Icaria, except for the residue at position 142, is similar to Hb Constant Spring and Hb Paksé (α_2 142, StopàGln and StopàTyr, respectively), which are frequent thalassemic alleles in southeastern Asia. The association of these variants with α^0 alleles has been thoroughly studied as the cause of both Hb H disease and thalassemia intermedia (Schrier *et al.*, 1997; Wajcman *et al.*, 2008).

The patient here described is a 2-year-old boy of mixed Italian and African origin, followed up at Centro Infantil Dr. Domingos A. Boldrini, in Campinas, state of São Paulo, southeastern Brazil. He presented chronic hemolytic anemia, pallor, jaundice and spleen enlarge-

Send Correspondence to Maria de Fátima Sonati. Departamento de Patologia Clínica, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brazil. E-mail: sonati@fcm.unicamp.br.

ment. Peripheral blood analysis revealed a remarkable degree of anisocytosis with microcytosis, hypochromia and 6.8% of reticulocytes. Serum ferritin was normal (45 ng/mL). The hematological data of the proband and his mother are summarized in Table 1. His father was not available for study.

Hb H, as well as its fetal version Hb Bart's - γ_4 , were both detected by alkaline electrophoresis and quantified by cation-exchange HPLC (High Performance Liquid Chromatography) (Variant II - β -Thalassemia Short Program; Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). The percentages for Hb H and Hb Bart's were 14.7% and 19.0%, respectively (Figure 1). The presence of these abnormal variants was further confirmed by electrophoresis at neutral pH (Dacie *et al.*, 2006). Hemoglobin instability was demonstrated by n-butanol, isopropanol and heat tests. Heinz and Hb H inclusion bodies were observed in the patient's red blood cells (Dacie *et al.*, 2006) but no further anomalous hemoglobin was identified in his peripheral blood sample. No abnormal variant whatsoever was detected in the mother's blood sample.

Genomic DNA was obtained from peripheral blood leukocytes. Multiplex PCR for the most common α -thal alleles (Tan *et al.*, 2001) revealed the presence of the $-(\alpha)^{20.5}$ deletion in the patient's DNA sample (Figure 2), which was confirmed by specific gap-PCR (Kattamis *et al.*, 1996). The deletion removes a 20.5 kb fragment of DNA containing the entire α_2 gene and part of the α_1 gene, the latter, however, is not expressed (Steinberg *et al.*, 2001; Weatherall and Clegg, 2001).

Table 1 - Hematological data of the patient and his mother, both of African ancestry.

Hematological parameters	Patient	Mother
RBC (million/L)	4.57	4.74
Hb (g/dL)	7.6	12.9
Hct (%)	29.3	39.7
MCV (fL)	64.1	83.8
MCH (pg)	16.6	27.2
RDW-CV (%)	27.6	13.0
Reticulocytes (%)	6.8	2.0
Serum ferritin (ng/mL)	45.85	36.75
Hb Profile	A2 + A + Bart's + H	A2 + A
Hb Barts (%)	19.0	-
Hb H (%)	14.7	-
α -genotype	$-(\alpha)^{20.5}/\alpha^H \text{Icaria} \alpha$	$\alpha\alpha/\alpha^H \text{Icaria} \alpha$

RBC = Red Blood Cells; Hb = Hemoglobin; Hct = Hematocrit; MCV = Mean Corpuscular Volume; MCH = Mean Corpuscular Hemoglobin; RDW-CV = Coefficient of Variation of the Red Cell Distribution Width.

Two α -globin genes still remained. Direct α -globin gene sequencing (ABI PRISM 377 DNA Automated Sequencer, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) with primers described elsewhere (Dodé *et al.*, 1990) identified base substitution (TAA $\rightarrow$ AAA) at the 142nd (termination) codon of the α_2 -globin gene (Figure 3). This mutation, also found in the patient's mother, was confirmed by sequenc-

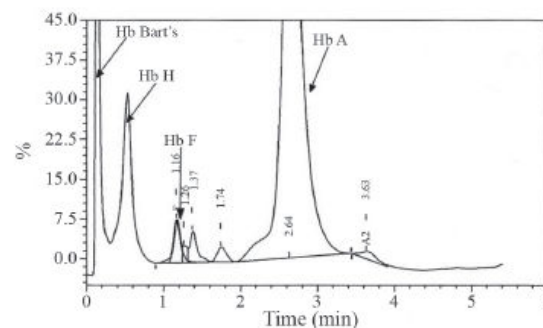


Figure 1 - Cation-exchange HPLC chromatogram of the patient's blood sample showing hemoglobins Bart's and H beside the normal hemoglobins (Hb A₂ and Hb A).

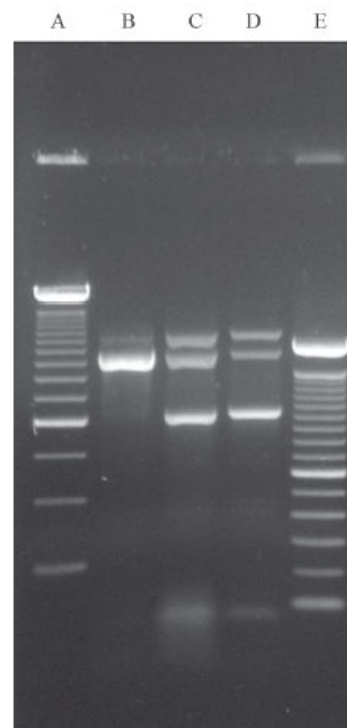


Figure 2 - Multiplex PCR for screening of the most common α -thal alleles (Tan *et al.*, 2001). A - 250 bp ladder marker; B - Normal Genotype Control ($\alpha\alpha/\alpha\alpha$); C - Patient [$-(\alpha)^{20.5}/\alpha^H \text{Icaria} \alpha$]; D - Positive control for the $-(\alpha)^{20.5}$ deletion; E - 100 bp ladder marker.

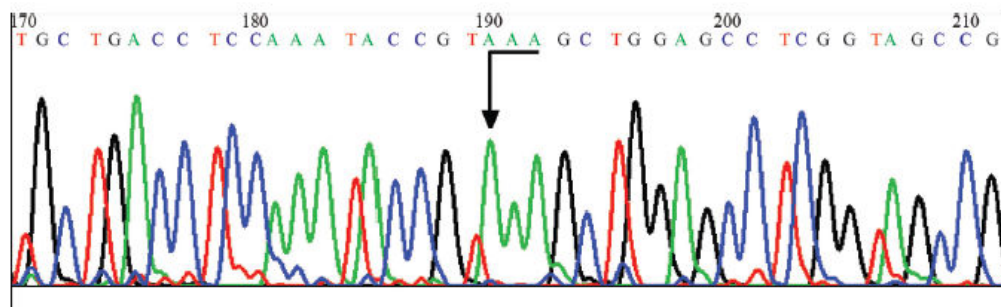


Figure 3 - α_2 -globin gene sequencing identifying the Hb Icaria mutation (c.427T > A).

ing the opposite strand of the DNA, this resulting in an elongated (and unstable) α -chain constituted by 31 extra residues: (142)Lys-Ala-Gly-Ala-Ser-Val-Ala-Val-Pro-Pro-Ala-Arg-Trp-Ala-Ser-Gln-Arg-Ala-Leu-Leu-Pro-Ser-Leu-His-Arg-Pro-Phe-Leu-Val-Phe-(172)Glu-COOH. A stop codon was found at the new codon 173 (Hardison *et al.*, 2002).

Hb Icaria is a rare Hb structural and thalassemic variant described in Greek, Yugoslavian and Macedonian families (Clegg *et al.*, 1974; Efremov *et al.*, 1990; Kanavakis *et al.*, 1996). It is difficult to detect in peripheral blood samples by the more commonly used techniques, due to its very low concentration and electrophoretic mobility, which is slower than that of Hb A₂ at alkaline pH (Clegg *et al.*, 1974). The pathophysiology of these elongated chains has been attributed to mRNA instability (Waggoner and Liebhaber, 2003), but more recent studies have shown that it could be due to defective interaction with AHSP (alpha-hemoglobin stabilizing protein) (Turbpaiboon *et al.*, 2006). In the patient investigated here, the low availability of α -chains was probably responsible for the high levels of Hb H and Hb Bart's observed (33.7% of the total hemoglobin). Despite this, the alteration does not give rise to important clinical manifestations in heterozygous individuals, the case of our patient's mother, who has the $\alpha\alpha/\alpha^{\text{Hb Icaria}}\alpha$ genotype and is clinically silent.

This is the first description of Hb H disease caused by a combination of $-(\alpha)^{20.5}$ deletion with Hb Icaria [$-(\alpha)^{20.5}/\alpha^{\text{Hb Icaria}}\alpha$] in the Brazilian population. It is also the first description of this variant in an individual of Italian and African origin. Our findings illustrate the importance of investigating these atypical cases and identifying their molecular basis and pathophysiological mechanisms. They also give us an idea of how frequent these mutations and associations are in our population.

Acknowledgments

We would like to thank the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, grant n.

02/13801-7) and the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for financial support.

References

- Clegg JB, Weatherall DJ, Contopolou-Griva I, Caroutsos K, Pongouras P and Tseveris H (1974) Haemoglobin Icaria, a new chain-termination mutant which causes alpha thalassaemia. *Nature* 251:245-247.
- Dacie JV, Lewis SM, Bain BJ and Bates I (2006) *Practical Haematology*. 9th edition. Artmed, Porto Alegre, 572 pp.
- Dodé C, Rochette J and Krishnamoorthy R (1990) Locus assignment of human alpha globin mutations by selective amplification and direct sequencing. *Br J Haematol* 76:275-281.
- Efremov GD, Josifovska O, Nikolov N, Codrington JF, Oner C, Gonzalez-Redondo JM and Huisman TH (1990) Hb Icaria-Hb H disease: Identification of the Hb Icaria mutation through analysis of amplified DNA. *Br J Haematol* 75:250-253.
- Hardison RC, Chui DHK, Giardine B, Riemer C, Patrinos GP, Anagnou N, Miller W and Wajcman H (2002) Hb Var: A relational database of human hemoglobin variants and thalassemia mutations at the globin gene server. *Hum Mut* 19:225-233.
- Higgs DR and Weatherall DJ (2009) The alpha thalassaemias. *Cell Mol Life Sci* 66:1154-1162.
- Kanavakis E, Traeger-Synodinos J, Papasotiriou I, Vrettou C, Metaxotou-Mavromati A, Stamoulakatou A, Lagona E and Kattamis C (1996) The interaction of alpha zero thalassaemia with Hb Icaria: Three unusual cases of haemoglobinopathy H. *Br J Haematol* 92:332-335.
- Kattamis AC, Camaschella C, Sivera P, Surrey S and Fortina P (1996) Human alpha-thalassemia syndromes: Detection of molecular defects. *Am J Hematol* 53:81-91.
- Schrier SL, Bunyaratvej A, Khuhapinant A, Fuchareon S, Aljurf M, Snyder LM, Keifer CR, Ma L and Mohandas N (1997) The unusual pathobiology of hemoglobin constant spring red blood cells. *Blood* 89:1762-1769.
- Steinberg MH, Forget BG, Higgs DR and Nagel RL (2001) *Disorders of Hemoglobin - Genetics, Pathophysiology and Clinical Management*. Cambridge University Press, New York, 1268 pp.
- Tan AS, Quah TC, Low PS and Chong SS (2001) A rapid and reliable 7-deletion multiplex polymerase chain reaction assay for alpha-thalassemia. *Blood* 98:250-251.



Revisão / Review

Identificação e caracterização de variantes novas e raras da hemoglobina humana

Identification of characterization of novel and rare variants of human hemoglobin

Elza M. Kimura¹Denise M. Oliveira¹Susan E. D. C. Jorge¹Cristina F. Abreu¹Dulcinéia M. Albuquerque²Fernando F. Costa²Maria de Fátima Sonati¹

As anormalidades estruturais da hemoglobina estão entre as doenças genéticas mais comumente encontradas nas populações humanas. O Laboratório de Hemoglobiopatias do Departamento de Patologia Clínica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas – Unicamp, localizado em Campinas, no estado de São Paulo, região Sudeste do Brasil, realizou, em seus 27 anos de existência, cerca de 130.000 diagnósticos. Entre as variantes estruturais detectadas, as hemoglobinas S, C e D-Punjab foram, como esperado, as mais freqüentes, porém um número expressivo de outras hemoglobinas anômalas, novas e raras, também foi encontrado. Esses achados estão sumarizados no presente artigo. Rev. bras. hematol. hemoter. 2008;30(4):316-319.

Palavras-chave: Hemoglobiopatias hereditárias; variantes estruturais; genes de globinas; população brasileira.

Introdução

Mutações nos genes das globinas podem levar à produção de hemoglobinas estruturalmente alteradas.¹ Há, atualmente, mais de 900 variantes estruturais descritas, a maioria ocasionada por simples substituições de bases no DNA, com a correspondente troca de aminoácidos na proteína.² Embora a maior parte dos casos seja de cadeias β , alterações de cadeias α , γ e δ são também relativamente comuns. Há um grande contingente não relacionado à sintomatologia clínica, mas algumas alterações afetam a estabilidade e/ou solubilidade da molécula ou modificam suas propriedades funcionais, levando às anemias hemolíticas e às eritrocitoses e cianoses, respectivamente. Há ainda variantes alongadas ou extremamente instáveis que resultam em fenótipos talasêmicos. Entre as variantes clinicamente importantes, a Hb S ($\alpha_2\beta_2^S$), da anemia falciforme, é sem dúvida a mais conhecida.^{1,2}

O Laboratório de Hemoglobiopatias do Departamento de Patologia Clínica da Faculdade de Ciências Médicas da

Unicamp, desde sua implantação, em 1980, analisou cerca de 130.000 amostras de sangue, provenientes de indivíduos com suspeita clínica de hemoglobiopatias e seus familiares, de doadores de sangue nos quais se detectou a presença de hemoglobinas estruturalmente alteradas, de programas de triagem neonatal e, ainda, de um programa sistemático de triagem de variantes desenvolvido no próprio laboratório. A maior parte das amostras é oriunda de indivíduos da região sudeste, mas outras regiões brasileiras também contribuíram para essa casuística, como a região nordeste e a região sul, bem como alguns outros países da América Latina, como a Argentina, o México, o Uruguai e a Venezuela. Até o momento, e excluindo-se as alterações de cadeias δ , genericamente intituladas HbA₂, 10 variantes novas e 51 variantes raras foram detectadas e identificadas, sendo 9 delas mutações *de novo*; 21 são alterações de cadeias α , 31 de cadeias β e 9 de cadeias γ , entre γ^C e γ^A . A maioria das variantes já descritas está sendo detectada no Brasil pela primeira vez. As tabelas de 1 a 4 apresentam esses resultados.

¹Departamento de Patologia Clínica, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas – Unicamp, Campinas-SP.

²Centro de Hematologia e Hemoterapia, Unicamp, Campinas, SP.

Correspondência: Maria de Fátima Sonati

Departamento de Patologia Clínica, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas – Unicamp, Campinas-SP
Caixa Postal 6111

13083-970 – Campinas-SP – Brasil

Tel.: 55 19 35219451; Fax 55 19 35219434

E-mails: sonati@fcm.unicamp.br (preferido); sonati_mf@yahoo.com.br (alternativo)

Tabela 1. Variantes Novas de Hb

Hemoglobina	Mutação
Hb Fetal-Campinas	GamaA 121(GH4) Glu>Gln
Hb Fetal-Joanópolis	GamaG 73 (E17) Asp>Ala
Hb Fetal-Paulínia	GamaG 80 (EF4) Asp>Tir
Hb Boa Esperança	Alfa2 16(A14) Lis>Tre
Hb Campinas	Alfa2 26(B7) Ala>Val
Hb Bom Jesus da Lapa	Alfa1 30(B11) Glu>Ala
Hb Itapira	Alfa1 30(B11) Glu>Val
Hb Rio Claro	Beta 33(B15) Val>Met
Hb Poços de Caldas	Beta 61(E5) Lis>Gln
Hb Florida*	Beta 141 (-C); sequência C- terminal modificada: (141)Tri-Pro-Tre-Ser-Ile-Tre-Lis-Leu-Ala-Fen-Leu-Leu-Ser-Asn-Fen-(156)Tir-COOH

*Mutação de novo

Tabela 2. Variantes raras de Cadeias α

Hemoglobina	Mutação
Hb Kurosaki*	Alfa1 7(A5) Lis>Glu
Hb J-Paris	Alfa2 12(A10) Ala>Asp
Hb Hasharon	Híbrido Alfa2/ Alfa1 47(CE5) Asp>His ($\alpha^{3,7}$)
Hb J-Rovigo	Alfa2 53(E2) Ala>Asp
Hb Shaare Zedek	Alfa2 56(E5) Lis>Glu
Hb Pontoise	Alfa2 63(E12) Ala>Asp
Hb Ube-2	Alfa1 68(E17) Asn>Asp
Hb Daneshgah-Tehran	Alfa2 72(EF1) His>Arg
Hb G-Pest*	Alfa2 74(EF3) Asp>Asn
Hb Stanleville-II	Híbrido Alfa2/ Alfa1 78(EF7) Asn>Lis ($\alpha^{3,7}$)
Hb Tamano	Alfa1 89(FG1) His>Arg
Hb Cemenelum	Alfa2 92(FG4) Arg>Tri
Hb Setif	Alfa2 94(G1) Asp>Tir
Hb Sunshine Seth*	Alfa1 94(G1) Asp>His
Hb Westmead*	Alfa2 122(H5) His>Gln
Hb Jackson	Alfa2 127(H10) Lis>Asn
Hb Icaria	Alfa2 142, Stop>Lis; sequência C- terminal modificada: (142)Lis-Ala-Gli-Ala-Ser-Val-Ala-Val-Pro-Pro-Ala- Arg-Tri-Ala-Ser-Gln-Arg-Ala-Leu-Leu-Pro- Ser-Leu-His-Arg-Pro-Fen-Leu-Val-Fen-(172)Glu-COOH

*Mutações de novo

A principal forma de detecção é feita a partir da mudança na carga elétrica da variante em função da troca de aminoácidos ocorrida. A Figura 1 resume a estratégia metodológica utilizada. A eletroforese de hemoglobinas em acetato de celulose, em pH alcalino, e a cromatografia líquida de alta performance (HPLC – High Performance Liquid Chromatography), de troca catiônica, são as técnicas empregadas na triagem, esta última permitindo também a quantificação da fração anômala e das hemoglobinas A₂ e Fetal. As variantes assim detectadas são então submetidas à eletroforese em gel de ágar, em pH ácido, aos testes de solubilidade e estabilidade (térmica, em n-butanol e em isopropanol) e

Tabela 3. Variantes Raras de Cadeias β

Hemoglobina	Mutação
Hb Deer Lodge	Beta 2(NA2) His>Arg
Hb G-San José	Beta 7(A4) Glu>Gli
Hb Porto Alegre	Beta 9(A6) Ser>Cis
Hb J-Baltimore	Beta 16(A13) Gli>Asp
Hb Miyashiro	Beta 23(B5) Val>Gli
Hb E	Beta 26(B8) Glu>Lis
Hb Grange-Blanche	Beta 27(B9) Ala>Val
Hb Pitie-Salpetriere	Beta 34(B16) Val>Fen
Hb Hammersmith*	Beta 42 (CD1) Fen>Ser
Hb Hoshida	Beta 43(CD2) Glu>Gln
Hb Osu Christiansborg*	Beta 52(D3) Asp>Asn
Hb Dhofar	Beta 58(E2) Pro>Arg
Hb Zurich	Beta 63(E7) His>Arg
Hb Korle-Bu	Beta 73(E17) Asp>Asn
Hb Santa Ana*	Beta 88(F4) Leu>Pro
Hb Redondo*	Beta 92(F8) His>Asn
Hb N-Baltimore	Beta 95(FG2) Lis>Glu
Hb Köln	Beta 98(FG5) Val>Met
Hb Coimbra	Beta 99(G1) Asp>Glu
Hb Camperdown	Beta 104(G6) Arg>Ser
Hb Indianápolis	Beta 112(G14) Cis>Arg
Hb Miami	Beta 116(G18) His>Pro
Hb D-Punjab	Beta 121(GH4) Glu>Gln
Hb Hofu	Beta 126(H4) Val>Glu
Hb J-Guantanamo	Beta 128(H6) Ala>Asp
Hb K-Woolwich	Beta 132(H10) Lis>Gln
Hb Lepore-Baltimore	Híbrido Delta-Beta (delta 50 Ser; beta 86 Ala)
Hb Lepore- Boston-Washington	Híbrido Delta-Beta (delta 87 Gln; beta 116 IVS-II-8)

*Mutações de novo

Tabela 4. Variantes raras de Cadeias γ

Hemoglobina	Mutação
Hb F-Pendergras	GamaA 36(C2) Pro>Arg
Hb F-Yamaguchi	GamaA 80(EF4) Asp>Asn E GamaA 75(E19) Ile>Tir
Hb F-Dickinson	GamaA 97(FG4) His>Arg
Hb F-Urumqi	GamaG 22(B4) Asp>Gli
Hb F-Carlton	GamaG 121(GH4) Glu>Lis
Hb F-Port Royal	GamaG 125(H3) Glu>Ala

à análise de cadeias globínicas, feita anteriormente por eletroforese e atualmente por HPLC de fase reversa (RP-HPLC). Paralelamente, os eritrócitos, após análise por contador eletrônico, são investigados quanto à presença de corpos de Heinz e de inclusão.³

Uma vez identificada a cadeia mutante, o gene correspondente é então seletivamente amplificado pela reação em cadeia da polimerase (PCR), e seqüenciado.^{4,6} A confirmação

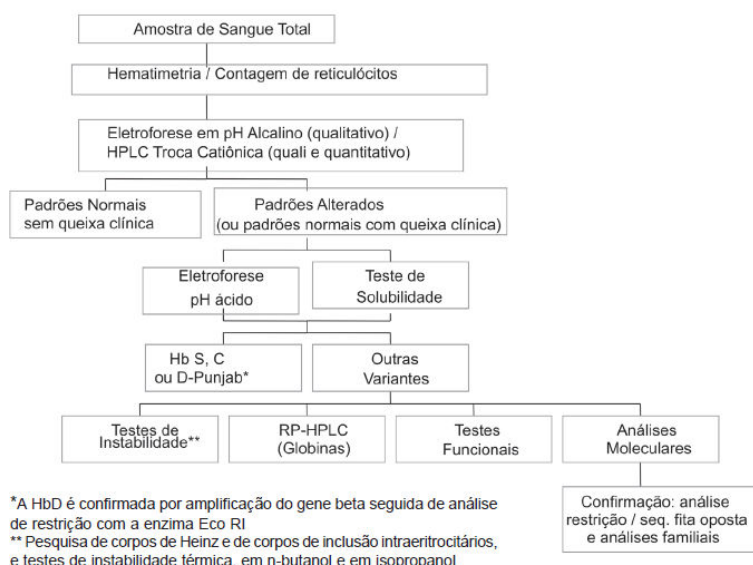


Figura 1. Representação Esquemática da Identificação e Caracterização de Variantes Estruturais da Hb

da mutação é feita, sempre que possível, por análise com enzimas de restrição e/ou sequenciamento da fita oposta de DNA, além da análise familiar. No caso de variantes estruturais de cadeias α , o status numérico desses genes é ainda investigado.^{7,8}

Finalmente, as propriedades funcionais da molécula anômala são avaliadas pelo método de cinética química de Rossi-Fanelli e Antonini, de 1958, através da curva de dissociação da hemoglobina com o O₂, da determinação da cooperatividade entre as cadeias globínicas e do efeito Bohr, na ausência e na presença de fosfatos orgânicos.⁹

Dentre as variantes clinicamente importantes aqui encontradas estão as hemoglobinas Hammersmith, Zürich, Redondo, Köln, Indianápolis, Miami, Hb Sunshine Seth e Miyashiro, proteínas instáveis que resultam em anemia hemolítica crônica de intensidade moderada a grave, as hemoglobinas Lepore-Baltimore e Lepore-Boston, híbridos de cadeias δ e β associados a fenótipo talassêmico ($\delta\beta^+$), a Hb Florida, constituída de cadeias β com 156 aminoácidos, hiperinstável e com fenótipo dominante de talassemia intermediária, a Hb E, também com fenótipo β -talassêmico, a Hb Coimbra e a Pitie-Salpetriere, encontradas em pacientes com eritrocitose, e as variantes Hasharon e Stanleyville-II, sempre associadas à deleção $-\alpha^{3,7}$ e ao correspondente fenótipo α -talassêmico.¹⁰⁻¹⁷

A Hb Boa Esperança foi detectada em dois portadores assintomáticos (doadores de sangue), mas os estudos *in vitro* revelaram propriedades funcionais alteradas, compensadas *in vivo*, provavelmente, pela maior proporção de

hemoglobina normal, de 75%.¹⁸ Já a Hb Itapira foi a variante representada em menor porcentagem, com cerca de 5,5%, porque a mutação que a deu origem ocorreu em um alelo α triplicado ($\alpha\alpha\alpha^{\text{anti-3,7}}$).¹⁸

Algumas associações incomuns foram observadas. Heterozigotos da Hb Porto Alegre são geralmente assintomáticos, mas sua concomitância com a Hb Santa Ana, gerada por mutação de novo, levou a um quadro clínico de anemia hemolítica grave, com necessidade de esplenectomia.¹⁹ A Hb Icaria, uma variante alongada e instável de cadeias α , foi recentemente encontrada em associação com a deleção $-(\alpha)^{20,5}$, resultando em Doença da Hb H com altos níveis das hemoglobinas H e Bart's, de 15% e 19%, respectivamente. A Hb Miami foi detectada em uma criança heterozigota da talassemia β^+ , o que levou a um quadro de anemia hemolítica bastante gra-

ve. Esta paciente havia sido primeiramente estudada por Hoyer *et al.*, na Clínica Mayo, nos Estados Unidos.²⁰ A Hb S, além das associações com as hemoglobinas C e D e com a talassemia β , foi detectada em interação com as variantes J-Rovigo, Grange-Blanche e Stanleyville-II.^{10,17} Esta última foi também detectada em associação com a Hb Campinas, uma das variantes novas descritas em nosso laboratório. A Hb Rio Claro, outra nova variante, foi encontrada em uma paciente também heterozigota da Hb Hasharon e, conseqüentemente, da talassemia α^+ .²¹ As hemoglobinas D e J-Rovigo foram ainda detectadas em concomitância à talassemia β .¹⁰

Esses resultados ilustram a expressiva variabilidade de hemoglobinas presente nas populações. Do ponto de vista clínico, seu correto diagnóstico previne procedimentos e esquemas terapêuticos equivocados, particularmente quando os indivíduos apresentam microcitose e hipocromia, ou nos casos de variantes com o mesmo comportamento eletroforético ou cromatográfico daquelas mais frequentemente observadas, como a Hb S. Do ponto de vista bioquímico, o estudo das variantes e de suas respectivas substituições de resíduos tem fornecido um importante modelo para a compreensão dos aspectos estruturais e funcionais desta e de outras proteínas, o mesmo ocorrendo com os genes de globinas e seus sistemas regulatórios. Do ponto de vista de genética de populações, sua investigação contribui de maneira significativa para o conhecimento da composição étnica e dos graus de miscigenação entre os diferentes grupos populacionais.

Abstract

Hemoglobin structural abnormalities are among the most commonly found human genetic diseases. The Laboratory of Hemoglobinopathies in the Clinical Pathology Department of the Medical Sciences School of the State University in Campinas - Unicamp, São Paulo, Southeastern Brazil, carried out, in its 27 years of activity, about 130,000 diagnoses. As expected, hemoglobins S, C and D were the most frequently observed variants, but an expressive number of other abnormal, novel and rare hemoglobins, was also detected. These findings are summarized in the present article. Rev. bras. hematol. hemoter. 2008;30(4):316-319.

Key words: Hereditary hemoglobinopathies; structural variants; globin genes; Brazilian population.

Agradecimentos

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes, pelo suporte financeiro aos projetos de pesquisa e pelas bolsas de estudo concedidas aos alunos de iniciação científica e de pós-graduação.

Referências Bibliográficas

- Steinberg MH, Forget BG, Higgs DR, Nagel RL. Disorders of Hemoglobin. Cambridge University Press, New York, 2001.
- Hardison RC, Chui DH, Giardine B *et al*. HbVar: A relational database of human hemoglobin variants and thalassemia mutations at the globin gene server. Hum Mutat. 2002;19(3):225-33 (<http://globin.cse.psu.edu>).
- Dacie JV, Lewis SM. Hematologia Prática de Dacie e Lewis, 9ª. ed., Artmed, Porto Alegre, 2006.
- Wenning MR, Kimura EM, Jorge SB *et al*. Molecular characterization of hemoglobins Kurosaki [alpha7 Lys-Glu], G-Pest [alpha74 Asp-Asn], Stanleyville-II [alpha78 Asn-Lys] and J-Rovigo [alpha53 Ala-Asp]. Acta Haematol. 1999; 102 (4):203-5.
- Kimura EM, Jorge SB, Ogo SH *et al*. A novel beta-globin variant: Hb Poços de Caldas [beta 61(E5)Lys-Gln]. Hemoglobin. 2002; 26(4):385-8.
- Duarte DF, Kimura EM, Albuquerque DM *et al*. Structural alterations of the gamma-globin genes in a Brazilian population. Hemoglobin. 2004;28(1):73-7.
- Dodé C, Krishnamoorthy R, Lamb J *et al*. Rapid analysis of -alpha 3.7 thalassaemia and alpha alpha alpha anti 3.7 triplication by enzymatic amplification analysis. Br J Haematol. 1993;83 (1):105-11.
- Tan AS, Quah TC, Low PS *et al*. A rapid and reliable 7-deletion multiplex polymerase chain reaction assay for alpha-thalassemia. Blood. 2001;98(1):250-1.
- Rossi-Fanelli A, Antonini E. Studies on the oxygen and carbon monoxide equilibria of human myoglobin. Arch Biochem Biophys. 1958;77(2):478-92.
- Abreu CF, Oliveira DM, Albuquerque DM *et al*. Hemoglobinas novas, raras e mutações de novo em pacientes atendidos no HC da Unicamp. Anais do 40º. Congresso Brasileiro de Patologia Clínica e Medicina Laboratorial (ISBN 85-60167-00-5), resumo 320, Curitiba (PR), setembro, 2006.
- Sonati MF, Kimura EM, Abreu CF *et al*. Hemoglobin Hammersmith [beta42 (CD1) Phe-Ser] in a Brazilian girl with congenital Heinz body hemolytic anemia. Pediatr Blood Cancer. 2006;47(6):855-6.
- Miranda SR, Kimura EM, Saad ST *et al*. Identification of Hb Zürich [alpha 2 beta 2(63)(E7)His-Arg] by DNA analysis in a Brazilian family. Hemoglobin. 1994;18(4-5):337-41.
- Fattori A, Kimura EM, Albuquerque DM *et al*. Hb Indianapolis [beta112 (G14) Cys-Arg] as the probable cause of moderate hemolytic anemia and renal damage in a Brazilian patient. Am J Hematol. 2007;82(7):672-5.
- Miranda SR, Figueiredo MS, Kerbaux J *et al*. Hb Lepore Baltimore (delta 50Ser beta 86Ala) identified by DNA analysis in a Brazilian family. Acta Haematol. 1994;91(1):7-9.
- Weinstein BI, Erramoupe B, Albuquerque DM *et al*. Hb Florida: a novel elongated C-terminal beta-globin variant causing dominant beta-thalassemia phenotype. Am J Hematol. 2006;81(5):358-60.
- Fattori A, Kimura EM, Albuquerque DM *et al*. Polycythemia and Hb Coimbra [beta99 (G1) Asp-Glu] in Brazil. Genet Mol Biol. 2006;29(2):200-2.
- Costa FF, Sonati MF, Zago MA. Hemoglobin Stanleyville II (alpha 78 Asn-Lys) is associated with a 3.7-kb alpha-globin gene deletion. Hum Genet. 1991;86(3):319-20.
- Jorge SE, Kimura EM, Oliveira DM *et al*. Three new alpha-globin variants: Hb Itapira [alpha30(B11)Glu-->Val (alpha1)], Hb Bom Jesus Da Lapa [alpha30(B11)Glu-->Ala (alpha1)] and Hb Boa Esperança [alpha16(A14)Lys-->Thr (alpha2)]. Hemoglobin. 2007; 31(2):151-7.
- Gonçalves MS, Sonati MF, Kimura M *et al*. Association of Hb Santa Ana [alpha 2 beta (2)88(F4)Leu- > Pro] and Hb Porto Alegre [alpha 2 beta (2)9(A6)Ser- > Cys] in a Brazilian female. Hemoglobin. 1994;18(3):235-9.
- Hoyer JD, Baxter JK, Moran AM *et al*. Two unstable beta chain variants associated with beta-thalassemia: Hb Miami [beta 116 (G18)his-->Pro], and Hb Hershey [beta70(E14)Ala-->Gly], and a second unstable Hb variant at 170: Hb Abington [beta70(E14)Ala-->Pro]. Hemoglobin. 2005;29(4):241-8.
- Grignoli CR, Wenning MR, Sonati MF *et al*. Hb Rio Claro [beta34(B16)Val-->Met]: a novel electrophoretically silent variant found in association with Hb Hasharon [alpha47(CE5)Asp-->His] and alpha-thalassemia-2(-alpha3.7). Hemoglobin. 1999;23(2): 177-82.

Avaliação: Editor e dois revisores externos
Conflito de interesse: não declarado

Recebido: 19/09/2007
Aceito: 25/09/2007

Livro: Medicina Genômica – Editora Nacional
Parte 2 – Clínica Genômica
Capítulo 5 – Hematologia

Maria de Fátima Sonati¹, Susan Elisabeth Domingues Costa Jorge², Fernando Ferreira Costa³

¹Livre-Docente em Hematologia em Patologia Clínica e Professora Associada da Área de Hematologia do Departamento de Patologia Clínica da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP. Contato: Depto. Patologia Clínica / FCM / UNICAMP - CEP 13083-970 – Caixa Postal 6111 – Campinas (SP) - Fone (019) 3521-9451 - Fax (019) 3521-9434 - e-mail: sonati@fcm.unicamp.br

²Farmacêutica e Bioquímica, Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP. Contato: Depto. Patologia Clínica / FCM / UNICAMP - CEP 13083-970 – Caixa Postal 6111 – Campinas (SP) - Fone (019) 3521-7589 - Fax (019) 3521-9434 - e-mail: susan@fcm.unicamp.br

³Professor Titular da Disciplina de Hematologia e Hemoterapia do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas-UNICAMP e Pesquisador do HEMOCENTRO-UNICAMP, Campinas – SP.
Contato: Hemocentro / UNICAMP - CEP 13083-970 – Caixa Postal 6198 - Campinas – SP - Fone (019) 3521-4726 - Fax (019) 3521-4798- e-mail: ferreira@unicamp.br

As Hemoglobinopatias Hereditárias

A anemia falciforme foi a primeira doença monogênica humana caracterizada ao nível molecular, por Linus Pauling e colaboradores, em 1949. Trata-se de uma hemoglobinopatia hereditária, um grupo de doenças genéticas, de distribuição mundial, causadas por mutações nos genes das globinas, a fração protéica da hemoglobina. As hemoglobinopatias representam as formas mais frequentes de anemia hemolítica hereditária. Suas bases moleculares são extremamente diversificadas e incluem desde simples substituições de nucleotídeos (SNPs – *Single Nucleotide Polymorphisms*) até extensas deleções que chegam a remover mais de uma megabase (Mb) de DNA. Tanto a hemoglobina como os genes de globinas são importantes modelos para o estudo de outras proteínas e genes sob os aspectos estruturais, funcionais e de regulação gênica. Sua investigação tem fornecido, ao longo do tempo, informações que têm levado ao estabelecimento de novos conceitos na Medicina e na Genética Humana, e contribuído sobremaneira com as áreas de Bioquímica, Biofísica, Genética Molecular e de Populações. As alterações hereditárias da hemoglobina são referenciais no que tange à compreensão dos aspectos fisiopatológicos e ao diagnóstico, prevenção e tratamento de doenças, estando entre as primeiras a sofrerem a abordagem das terapias gênica e celular.

Hemoglobinas humanas e genes de globinas

As hemoglobinas humanas são tetrâmeros globulares constituídos por duas cadeias polipeptídicas (globinas) do “tipo α ” (α ou ζ) e duas do “tipo β ” (ϵ , γ , δ ou β), cada uma delas ligada a um grupo prostético heme, que, por sua vez, se liga reversivelmente à molécula de oxigênio (O_2). Em elevada concentração nos eritrócitos (640 milhões de moléculas por célula), a principal função das hemoglobinas é transportar o O_2 dos pulmões para os tecidos e retornar o CO_2 dos tecidos para os pulmões.

Genes distintos, separados em agrupamentos (*clusters*), são responsáveis pela síntese das cadeias globínicas (Figura 1). Os genes que codificam as cadeias α e ζ , com 141 aminoácidos, constituem o *cluster* α , localizado na região telomérica do braço curto do cromossomo 16 (16p13.3); já os genes que codificam as cadeias β , δ , γ e ϵ , com 146 aminoácidos, compõem o *cluster* β , localizado no braço curto do cromossomo 11 (11p15.5). A combinação de seus respectivos produtos leva à formação das diferentes hemoglobinas, adaptadas aos diferentes períodos do desenvolvimento humano. Assim, no período embrionário, são produzidas as hemoglobinas embrionárias Gower I ($\zeta_2\epsilon_2$), Gower II ($\alpha_2\epsilon_2$) e Portland I ($\zeta_2\gamma_2$); estas dão lugar à hemoglobina (Hb) Fetal ou F ($\alpha_2\gamma_2$), durante o período fetal, que é finalmente substituída pelas hemoglobinas A ($\alpha_2\beta_2$) e A₂ ($\alpha_2\delta_2$) na vida adulta. Seis meses após o nascimento, a HbA é predominante, compondo mais de 95% do total da hemoglobina celular, enquanto a A₂ se mantém em níveis entre 2-3% e a Fetal entre 0-2%.

As doenças da hemoglobina

Mutações que afetam os genes de globinas originam as hemoglobinopatias. Elas são, na maioria das vezes, de caráter autossômico recessivo e levam à produção de variantes estruturalmente anômalas ou a um

desequilíbrio no ritmo de síntese das cadeias globínicas (as talassemias). Há, ainda, uma condição benigna – denominada Persistência Hereditária da Hb Fetal (PHHF) - em que os genes das cadeias γ se mantêm ativos na vida adulta.

Os mecanismos moleculares mais comumente relacionados às variantes estruturais são a substituição, inserção ou deleção de um ou de alguns nucleotídeos em regiões codificantes dos genes de globinas. Atualmente, há mais de mil hemoglobinas estruturalmente anômalas descritas (<http://globin.cse.psu.edu/>), sendo a mais importante delas, pela frequência e pelas consequências clínicas, a HbS [β_6 (A3) Glu $\rightarrow$ Val], da anemia falciforme (SS).

As talassemias são causadas por mutações que levam à redução ou ausência de síntese de um ou mais tipos de cadeias globínicas, com acúmulo do outro tipo cuja síntese está preservada. Estas, em excesso, formam agregados instáveis que precipitam e causam alterações à membrana dos eritrócitos e à destruição prematura das células. O menor teor de hemoglobina das células resulta em hipocromia e microcitose, alterações hematológicas características deste grupo de doenças. As talassemias são classificadas conforme o(s) tipo(s) de cadeia cuja síntese está alterada (α , β , γ , δ , $\delta\beta$, e $\gamma\delta\beta$). As mais frequentes são as talassemias α , encontradas em praticamente todas as populações investigadas, mas as talassemias β , embora menos prevalentes e mais concentradas em determinadas populações, têm maior importância clínica.

A PHHF pode ser causada por deleções dentro do *cluster* β que deixam um ou ambos os genes γ intactos, ou por mutações de ponto nas regiões promotoras desses genes. Como não há o desequilíbrio na síntese das cadeias, como observado nas talassemias, seus portadores são, em geral, assintomáticos. Esta condição, na verdade, favorece a evolução clínica de pacientes talassêmicos ou com doenças falciformes, e seus mecanismos têm sido investigados com objetivos terapêuticos.

Prevalências

As hemoglobinopatias estão entre as doenças monogênicas mais frequentemente encontradas nas populações, responsáveis por aproximadamente 3,4% dos óbitos em crianças com até 5 anos de idade (OMS, 2008). Elas acometem principalmente populações originárias do continente africano, da região Mediterrânea, do Sudeste Asiático e do Oriente Médio.

Há mais de mil diferentes alelos mutantes caracterizados até o momento, muitos deles relacionados a manifestações clínicas importantes. Destes, como já mencionado, destacam-se os que causam as doenças falciformes e as talassemias β e α . Estima-se que o nascimento anual de indivíduos afetados seja superior a 330.000/ano, dos quais 83% são portadores de doenças falciformes e 17% de talassemia (OMS, 2008). No Brasil, 5 a 10% da população afro-descendente é de heterozigotos da HbS (AS), enquanto 1% da população caucasóide da região sudeste é portadora da talassemia β . A talassemia α , forma α^+ afeta cerca de 23% dos brasileiros de descendência africana. Tais prevalências possivelmente se devem à seleção positiva exercida pela malária nas áreas endêmicas, seguida de movimentos migratórios e miscigenação racial. Em algumas regiões africanas endêmicas, por exemplo, a frequência do gene β^S chega a ser superior a 40%.

As Doenças Falciformes

Mecanismo Molecular

A anemia falciforme é causada pela homozigose do gene β^S (β 20 $\text{GAG} \rightarrow \text{GTG}$); ele codifica as cadeias β^S , que na posição 6 tem o ácido glutâmico substituído pela valina ($\beta^6 \text{Glu} \rightarrow \text{Val}$). A HbS é assim formada por duas cadeias α normais e duas cadeias β^S ($\alpha_2\beta^S_2$). Enquanto a oxi-HbS comporta-se de maneira similar às hemoglobinas normais, a desoxi-HbS sofre polimerização no interior dos eritrócitos, o que os torna anormalmente rígidos e não deformáveis (hemácias falcizadas), resultando em anemia hemolítica e vaso-oclusão, com danos teciduais e dor. Combinações da HbS com outras variantes da hemoglobina ou com a talassemia β podem originar quadros clínicos similares ao da anemia falciforme e são então denominadas “doenças falciformes” (DF). As mais freqüentes são a SC, a SD e a S- β talassemia. Já os heterozigotos da HbS (AS) são, via de regra, assintomáticos e protegidos da infecção pela malária. São chamados de “traços siclêmicos”.

Manifestações Clínicas e Moduladores Genéticos de Gravidade

Os efeitos pleiotrópicos do gene β^S incluem anemia hemolítica crônica, de intensidade moderada ou grave, episódios dolorosos e intermitentes de vaso-oclusão, risco permanente de infecções como resultado de auto-infarto esplênico, síndrome torácica aguda, hipertensão pulmonar, particularmente em adultos, acidentes vasculares cerebrais (AVCs), priapismo, retinopatia e danos cumulativos em múltiplos órgãos. Inflamação, ativação do endotélio, alterações da membrana eritrocitária, adesão de leucócitos, ativação plaquetária e da coagulação e biodisponibilidade reduzida de fatores vaso-ativos, como o óxido nítrico (NO), se somam às propriedades anormais da HbS, contribuindo para a ocorrência e gravidade dos fenômenos vaso-oclusivos.

Embora o defeito molecular seja o mesmo, os pacientes apresentam uma grande heterogeneidade clínica, sugerindo a influência de outros fatores genéticos e também ambientais na modulação da doença. Entre os moduladores genéticos mais conhecidos estão a talassemia α e os níveis de HbF. Na talassemia α , a reduzida disponibilidade de cadeias α leva à uma concentração intracelular menor de HbS. Os pacientes apresentam menor grau de hemólise e de anemia e maior vida média quando comparados aos não talassêmicos. Níveis mais elevados de HbF também contribuem para uma evolução clínica mais positiva, com maior expectativa de vida. As razões ainda não estão totalmente elucidadas mas experimentos *in vitro* demonstraram que os híbridos $\alpha_2\gamma\beta^S$ não sofrem polimerização.

Muitos fatores parecem ser capazes de influenciar as concentrações de HbF nos eritrócitos; os mais estudados são a presença simultânea de PHHF e os diferentes haplótipos do cluster β (conjunto de polimorfismos distribuídos ao longo do cluster). Entre eles, os haplótipos Camarões e Indiano estão associados a evoluções clínicas mais favoráveis, enquanto o haplótipo CAR se correlaciona à maior gravidade da doença. Alguns SNPs presentes no mesmo *locus*, como o polimorfismo C $\rightarrow$ T reconhecido pela enzima de restrição *Xmn I* no gene γ^G , ou em outros *loci*, como aqueles recentemente encontrados nos

cromossomos 6 (6q23) e 2 (2p15), têm também sido relacionados à modulação da produção de HbF (Figura 2).

Além dos acima descritos, polimorfismos em genes relacionados à inflamação, às interações intercelulares e à biologia do óxido nítrico vêm igualmente sendo investigados. São exemplos os genes HLA-DRB1*03 e HLA-DRB1*02, do sistema HLA, o primeiro associado a uma maior tendência aos AVCs e o segundo a um efeito mais protetor, e o antígeno plaquetário HPA-5b, relacionado ao risco de complicações vasculares nas DF.

Diagnóstico

O diagnóstico laboratorial das DF é bastante simples. Ele é realizado através de técnicas que se baseiam principalmente na carga elétrica das variantes, como a eletroforese, a focalização isoeletrica e a cromatografia líquida de alta performance (HPLC – *high performance liquid chromatography*). No caso da Hb S, os testes de falcização e de solubilidade da desoxi-HbS em tampão fosfato de alta molaridade podem ser empregados na confirmação e/ou triagem de portadores. A Espectrometria de Massas em Tandem (EMT) é um outro método que, apesar do custo ainda elevado, pode realizar, com bastante precisão e rapidez, a identificação das variantes, sendo uma promissora técnica para ampla aplicação futura, principalmente em testes para triagem de hemoglobinas anômalas em neonatos, já que a detecção precoce das DF é fundamental para a redução da morbidade e mortalidade dessas doenças. Qualquer que seja o método de escolha, cumpre enfatizar que o estudo familiar é de suma importância para o estabelecimento final do diagnóstico.

Técnicas moleculares têm sido mais reservadas ao diagnóstico pré-natal da AF, que pode ser feito a partir de amostras de DNA extraídas de células fetais do líquido amniótico, da vilosidade coriônica ou do plasma materno. As várias estratégias propostas se baseiam na reação em cadeia da polimerase (PCR) para amplificação do gene da globina β , seguida de análise dos produtos por enzimas de restrição. Plataformas do tipo *microarrays*, para detecção das mutações mais comuns, também já estão disponíveis e, em futuro próximo, poderão substituir o diagnóstico convencionalmente realizado.

Tratamento e Prognóstico

O tratamento clássico das DF inclui a terapêutica dos episódios agudos (crises de falcização) e das infecções, e o uso profilático de penicilina e da vacinação contra pneumococos e *Haemophilus influenzae* do tipo b, microrganismos encapsulados aos quais crianças com DF são especialmente susceptíveis.

Várias drogas têm sido testadas com o objetivo de reativar os genes γ e elevar a produção de HbF, como a 5-azacitidina, o butirato de sódio e a hidroxiuréia (HU). Esta última é, até o momento, a única aprovada para uso em pacientes com DF, mas seu exato mecanismo de ação ainda não é completamente conhecido. É possível que, por ser uma droga mielossupressora, seus efeitos não se devam somente ao aumento dos níveis de HbF, mas também à redução do número de leucócitos e do estado inflamatório. Além disso, a HU parece afetar o grau de hidratação das hemácias, a adesão ao endotélio e a produção de NO. Pacientes que recebem essa droga apresentam menores contagens de reticulócitos circulantes e menor número de células densas. Vários estudos multicêntricos têm demonstrado que ela diminui eficientemente a frequência de crises dolorosas, de ocorrências de síndrome torácica aguda e de necessidade de transfusões

sanguíneas, reduzindo a mortalidade em cerca de 40%. Apesar disso, em relação à população pediátrica, seus efeitos no longo prazo e, particularmente, seu potencial carcinogênico, ainda não estão bem estabelecidos.

A opção de cura para quem tem um doador compatível na família é o transplante alogênico de células hematopoéticas, que apresenta uma taxa de sobrevivência superior a 90% e de sobrevivência livre de eventos de 85%. O maior sucesso é obtido em pacientes com idade inferior a 16 anos, porque estes ainda não acumularam as disfunções orgânicas que reduzem as chances de êxito dos transplantes feitos em pacientes mais velhos. Uma alternativa que se revela bastante promissora é o transplante de células hematopoéticas de sangue de cordão umbilical de doadores relacionados. Nesse sentido, um grande número de bancos de sangue de cordão umbilical têm sido implantados em todo o mundo.

Outras terapias anti-falcizantes, como o poloxâmero surfactante 188, que aumenta a solubilidade da HbS e reduz a viscosidade sanguínea, e de anti-adesão, como os polissacarídeos aniônicos, as IgG e anti-inflamatórios como as estatinas, têm sido testados quanto à capacidade de redução dos eventos de vaso-oclusão. Agentes que melhoram a hidratação das hemácias e, com isso, aumentam os níveis de hemoglobina, como o clorotrimazol, que bloqueia o canal de Gardos, e a suplementação oral de magnésio, vêm sendo testados em modelos animais com sucesso e também constituem uma possibilidade promissora. Há ainda os fármacos doadores de NO, como, além da HU, a L-arginina (via oral) e o nitrato de sódio (por inalação), cujas dificuldades de manuseio ainda não estão bem resolvidas, os agentes que reduzem a produção de ROS, como a xantina oxidase, e as drogas que limitam a adesão celular ao endotélio. O sildenafil amplifica a resposta de NO na musculatura vascular e vem sendo testado em ensaios clínicos para tratar a hipertensão pulmonar na AF. A possibilidade de causar priapismo nos pacientes masculinos, no entanto, ainda é um receio. Experimentos recentes e *in vitro* têm demonstrado que, na presença de doadores de NO como o nitroprussiato de sódio e a dietilaminaNONOato (DEANO), a adesão dos neutrófilos à fibronectina e à proteína ICAM-1, aumentada nas DF, torna-se significativamente menor, o que indica que fármacos capazes de aumentar a biodisponibilidade de NO podem representar uma terapêutica futura para os pacientes com DF.

Vetores retrovirais que poderiam se integrar permanentemente no genoma das células tronco hematopoéticas e corrigir a mutação ou seus efeitos também vêm sendo testados em modelos animais. Entre as principais dificuldades da terapia gênica estão a obtenção de integração dos vetores nesse tipo celular e de uma maior estabilidade viral. O silenciamento do gene β^S por RNA de interferência (RNAi), ou a recombinação homóloga para substituição do gene β^S pelo gene β^A , ainda dependem de um aprimoramento dos métodos de transferência gênica e de comprovação em modelos animais.

Uma técnica que se encontra em fase inicial de experimentação é a de reprogramação celular, em que as terapias gênica e celular aparecem associadas. Mediada pelo estímulo de células pluripotentes, ela permitiria a correção *ex-vivo* da mutação, que seria então seguida do transplante das células “geneticamente” corrigidas.

As Talassemias α

Mecanismos Moleculares

A primeira descrição clínica da talassemia α ocorreu em meados de 1950 por dois pesquisadores independentes, Rigas e Goultas, nos Estados Unidos e na Grécia, respectivamente. Eles descreveram uma forma de anemia microcítica e hipocrômica em pacientes que não apresentavam aumento das concentrações das hemoglobinas A₂ e F, mas níveis variáveis de uma hemoglobina de migração rápida, posteriormente denominada HbH, um tetrâmero de cadeias β normais.

Em 1958 veio a segunda indicação da existência de talassemia α , quando Ager e Lehmann descobriram a Hb Bart's em um RN talassêmico. Bart's é a forma abreviada com que o *St. Bartholomew's Hospital*, de Londres, é conhecido. A Hb Bart's é constituída por quatro cadeias γ , sendo a contrapartida fetal da HbH. Um ano depois, Ingram & Stretton sugeriram que duas formas de talassemia, α e β , resultariam da produção deficiente das referidas cadeias. Somente em 1965, porém, Weatherall proveu as evidências experimentais dessa hipótese, demonstrando, através da síntese *in vitro* de hemoglobina, o desequilíbrio na produção das cadeias α e β nos reticulócitos de indivíduos talassêmicos.

Somente a partir da década de 1970, com o advento da Biologia Molecular, a estrutura e organização dos genes α puderam ser compreendidas. Eles são duplicados (α_2 e α_1) e estão localizados no braço curto do cromossomo 16 (16p13.3); codificam cadeias α idênticas, uma vez que as divergências entre ambos ocorrem em regiões não codificantes. O genótipo α normal é representado por $\alpha\alpha/\alpha\alpha$.

A causa mais freqüente de talassemia α são as deleções, que podem remover um ou ambos os genes α no genoma haplóide (alelos α^+ e α^0 , respectivamente). Da combinação desses alelos resultam cinco diferentes genótipos talassêmicos: $-\alpha/\alpha\alpha$, $-\alpha/-\alpha$, $--/\alpha\alpha$, $--/-\alpha$ e $--/--$. Os três primeiros não ocasionam manifestações clínicas ou hematológicas importantes; a presença de um único gene α no genoma diplóide corresponde à Doença da HbH, uma anemia hemolítica crônica de intensidade moderada ou grave, e a ausência completa dos genes α leva à Hidropisia Fetal por Hb Bart's, quadro sindrômico clinicamente muito grave e, em geral, incompatível com a vida devido aos elevados níveis de Hb Bart's, variante com elevada afinidade pelo O₂.

A formação de alelos α^+ é causada pelo pareamento incorreto dos cromossomos 16 durante a meiose, com consequente *crossing over* desigual e formação de um cromossomo com apenas um dos genes e outro com genes α triplicados. Os pareamentos incorretos são favorecidos pelo alto grau de homologia que existe entre as regiões que contêm os genes α nos cromossomos 16. A deleção que mais comumente causa a talassemia α^+ remove 3,7 Kb de DNA deixando um único gene α funcional, um híbrido α_2 - α_1 , que contém a porção inicial (5') do gene α_2 e a porção final (3') do gene α_1 (deleção $-\alpha^{3,7}$, *rightward deletion*).

Já a talassemia α^0 é oriunda de eventos de recombinação não homóloga, sendo as as deleções $--^{MED}$ e $-(\alpha)^{20,5}$, freqüentes na região Mediterrânea, e $--^{SEA}$, no Sudeste Asiático, as mais comuns.

Deleções envolvendo o α -MRE (α -Major Regulatory Element, ou HS-40), o principal elemento regulatório dos genes α , localizado a 40 kb do *cluster* em direção ao telômero do braço curto do cromossomo

16, são responsáveis por uma forma bastante rara de talassemia α , com apenas alguns casos esporádicos na literatura (Figura 3). Elas afetam a expressão dos genes α , que, no entanto, encontram-se estruturalmente intactos. Essas alterações têm sido detectadas em associação com deleções α^+ em casos de doença da HbH em que os pacientes apresentam três genes α .

As talassemias α não-delecionais, representadas genericamente por α^T , são menos frequentes e ocasionadas por mutações de ponto ou pequenas deleções que interferem no processamento, na tradução do mRNA ou na estabilidade da variante. Entre as mais comuns estão a mutação α^{HphI} , uma deficiência de 5 nucleotídeos envolvendo o sítio doador de *splicing* do primeiro *intron* do gene α_2 , e as formas α^{NcoI} e $\alpha\alpha^{NcoI}$, causadas por mutações no código de iniciação da cadeia, nos genes α_2 e α_1 , respectivamente. Elas podem ser detectadas pela análise com as respectivas enzimas de restrição.

Mutações na AHSP (*Alpha-Hemoglobin Stabilizing Protein*) podem também resultar em talassemia α . Esta proteína é uma chaperona que forma complexos estáveis com as cadeias α recém-sintetizadas, impedindo sua precipitação. Ainda, alterações no grupo heme, bem como nos complexos protéicos que se ligam à região 3' não traduzida (3'-UTR) do cluster α e são responsáveis pelo processamento e estabilização dos transcritos dessas cadeias, embora mais raras, começam a ser investigadas.

Manifestações Clínicas

A heterozigose da talassemia α^+ ($-\alpha/\alpha\alpha$) resulta em uma talassemia clinicamente silenciosa, que por seu caráter assintomático, pode não ser detectada por técnicas laboratoriais convencionais, já que o perfil hematológico e a análise de hemoglobinas dos portadores pode não revelar nenhuma alteração, a não ser a presença de 1 - 3% de Hb Bart's ao nascimento e, em alguns casos, uma discreta hipocromia e microcitose na vida adulta. Já a heterozigose da talassemia α^0 ($--/\alpha\alpha$), assim como a homozigose da talassemia α^+ ($-\alpha/\alpha$), correspondem à microcitose e hipocromia mais acentuadas e à presença de 5 a 10% de Hb Bart's ao nascimento. Nesses três casos, a HbH formada na vida adulta é rapidamente proteolisada pela célula e não chega, normalmente, a ser detectada ou causar dano hematológico.

A homozigose da talassemia α^0 (Hidropisia Fetal por Hb Bart's) é a forma mais grave das síndromes talassêmicas, sendo causa constante de abortos ou morte logo após o nascimento em populações onde a talassemia α^0 tem alta prevalência. Nesse caso, a eletroforese mostra a presença de quase 100% de Hb Bart's, com pequenas quantidades de Hb Portland e traços de HbH. A elevada proporção de Hb Bart's causa intensa hipóxia tecidual e anemia grave, com hepatoesplenomegalia, ascite e hidropisia, resultando em morte fetal ou neonatal somente evitada por transfusões sanguíneas intra-útero regulares.

A Doença da HbH ($--/\alpha$) manifesta-se clinicamente de maneira variável. Os pacientes apresentam alterações hematológicas pronunciadas (hipocromia, microcitose e pecilocitose moderadas, hemácias policromatófilas, hemácias em alvo), anemia hemolítica crônica e esplenomegalia. Outras complicações clínicas podem ocorrer, como infecções (principalmente após esplenectomia), cálculos biliares, deficiência de ácido fólico e episódios de hemólise aguda em resposta a tratamentos com drogas oxidantes. A Hb Bart's compõe cerca de 25 a 30% do total de hemoglobina ao nascimento, sendo substituída nos primeiros meses de

vida pela HbH (de 5 a 30% em média na vida adulta). A HbH precipita nas hemácias, formando agregados que lesam a membrana celular e causam hemólise precoce. Como as cadeias α integram tanto a HbF como a HbA, as manifestações da doença podem ocorrer na vida intra-uterina, no recém nascido e no adulto. A gravidade do quadro clínico depende da quantidade de HbH produzida. Na maioria das vezes, a doença é causada pela concomitância de uma deleção α^+ com uma deleção α^0 ($--/\alpha$), mas a associação de uma deleção com uma forma não delecional resulta geralmente em quadros clínicos mais graves, com níveis mais elevados de HbH. A explicação para isso é que o gene α remanescente, quando da ocorrência de deleção α^+ , possivelmente aumenta de maneira compensatória sua expressão, o que não ocorre quando ambos os genes estão presentes, embora um deles esteja inativado. Por outro lado, mutações que afetam os genes α_2 levam a quadros mais severos do que aquelas envolvendo os genes α_1 , porque os primeiros têm expressão de duas a três vezes maior do que aquela apresentada pelos genes α_1 .

Diagnóstico

A Hidropisia Fetal por Hb Bart's é diagnosticada por níveis superiores a 80% de Hb Bart's em sangue periférico ou de cordão umbilical. A Doença da HbH é reconhecida laboratorialmente pela presença da HbH em amostras de sangue periférico. Já a heterozigose e a homozigose da talassemia α^+ e a heterozigose da talassemia α^0 só podem ser diagnosticadas com segurança por técnicas moleculares, que são também empregadas no diagnóstico pré-natal e na determinação das bases moleculares da doença de HbH.

As deleções mais comuns podem ser detectadas pela técnica de *gap*-PCR simples, ou em reações *multiplex*, com a utilização de iniciadores que flanqueiam as regiões deletadas. Esta estratégia, no entanto, identifica apenas mutações já conhecidas. A técnica de MLPA (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*), descrita em 2002 e aplicada ao estudo das hemoglobinopatias a partir de 2005, vem sendo empregada na caracterização de novas deleções, particularmente daquelas de grande extensão, com inclusão ou não do elemento regulatório HS-40. Ela consiste na ligação e amplificação, através da reação de PCR, de sondas, marcadas com fluorocromos, que se ligam a regiões específicas do DNA. Cada par de sondas gera um produto de comprimento único, passível de ser analisado por eletroforese capilar.

Análise dos produtos de PCR com enzimas de restrição ou reações de amplificação alelo-específicas são as estratégias mais usadas no diagnóstico das talassemias α não delecionais já conhecidas, enquanto o sequenciamento direto dos genes α , seletivamente amplificados, é o método usado para identificação de mutações novas ou raras, sendo possível selecionar previamente o éxon mutado por técnicas de triagem como o SSCP (*Single Strand Conformation Polymorphism*) ou o dHPLC (*Denaturing High Performance Liquid Chromatography*).

A quantificação da expressão dos genes α por PCR quantitativo em Tempo Real (qRT-PCR) torna possível o diagnóstico mesmo quando os genótipos não estão esclarecidos. A comparação dos níveis de expressão desses genes em relação aos do gene β pode ser feita através de reações individualizadas ou *multiplex*.

Talassemia Alfa e Retardo Mental

As síndromes ATR-16 e ATR-X representam duas formas de talassemia α associada ao retardo mental. A primeira resulta de deleções que removem a extremidade do braço curto do cromossomo 16, onde se encontra o elemento regulatório α -MRE e genes relacionados ao retardo mental. Os fenótipos variam de talassemia α com discreto ou moderado retardo mental a um amplo espectro de dismorfismos e anormalidades do desenvolvimento. É possível que os genes removidos sejam responsáveis pela produção de proteínas cujos efeitos sejam criticamente dependentes da quantidade produzida.

A síndrome ATRX resulta de alterações no gene de mesmo nome, ligado ao cromossomo X, responsável por uma proteína envolvida no remodelamento da cromatina, regulatória da expressão gênica. As crianças afetadas são sempre do sexo masculino e apresentam retardo mental grave, padrões similares de dismorfismo facial, anormalidades urogenitais, e uma forma não comum e mais discreta de Doença de Hb H. Como todas as mutações nesse gene levam à talassemia α , é possível que dessa proteína dependa a correta expressão dos genes α .

Talassemia Alfa Adquirida

Uma forma rara e atípica de Doença da HbH pode ser adquirida no curso das pré-leucemias e doenças mieloproliferativas. Os pacientes são em sua maioria homens, e a quantidade de HbH produzida é bastante heterogênea. Há, no sangue periférico, concomitância de reticulócitos com produção normal de cadeias α e reticulócitos que não produzem absolutamente nada, o que indica a origem clonal da doença. A redução nos níveis de expressão dos genes α parece ser ocasionada pela supressão da transcrição dos genes α , uma vez que rearranjos ou deleções nesses genes não têm sido observados nas células pré-leucêmicas, nem tampouco alterações no processamento pós transcricional do RNA ou na hipometilação dos genes α .

Tratamento e Prognóstico

A abordagem terapêutica da doença de HbH é similar àquela empregada nas talassemias β e depende da gravidade das manifestações clínicas, como exposto em detalhes no próximo tópico. A Síndrome da Hidropisia Fetal por Hb Bart's pode ser tratada com transfusões intra-uterinas periódicas e transplante de medula óssea/células hematopoiéticas após o nascimento. O sucesso desses procedimentos, no entanto, tem sido relativo.

Um maior conhecimento sobre os mecanismos regulatórios que controlam a expressão dos genes α é ainda necessário para que se possa propor novas alternativas.

As Talassemias β

Mecanismos Moleculares

As talassemias β (redução ou ausência de síntese das cadeias β da hemoglobina) são importantes causas de anemia microcítica e hipocrômica e, diferentemente da anemia por deficiência de ferro ou das talassemias α , ocorrem com aumento dos níveis de Hb A₂ nos heterozigotos e de HbF nos homozigotos. Os diferentes

quadros clínicos resultam da combinação de alelos β^0 (ausência de expressão) e β^+ (redução de expressão), o último com grau de expressão bastante variável, a depender da região do gene afetada pela mutação: há alelos β^+ que correspondem à produção quase normal de cadeias β , enquanto outros ficam muito próximos dos alelos β^0 . Os genótipos $\beta^0\beta^0$, $\beta^0\beta^+$ e $\beta^+\beta^+$ estão associados às formas clínicas mais graves da doença, talassemia maior e intermediária, enquanto os heterozigotos $\beta\beta^0$ e $\beta\beta^+$ representam a talassemia menor ou o traço talassêmico β . Mutações de ponto em regiões não codificantes do gene β são as causas mais frequentes. Deleções, como aquelas que causam as talassemias α , são raras aqui.

As talassemias β são mais comumente encontradas em populações oriundas da região Mediterrânea e do Sudeste Asiático, com cerca de 200 alelos mutantes descritos até o momento. Cada população tem o seu espectro próprio, com um ou alguns alelos predominantes. Na população caucasóide brasileira, a frequência média de portadores é de aproximadamente 1%; os alelos β^039 (C→T), $\beta^+IVS-I-6$ (T→C), $\beta^+IVS-I-110$ (G→A) e $\beta^0IVS-I-1$ (G→A) respondem pela quase totalidade dos casos nas regiões sul e sudeste, enquanto o alelo $\beta^+IVS-I-5$ (G→C), além dos primeiros, corresponde a 9,3% dos alelos β -talassêmicos na região nordeste. A mutação β^039 , que atinge frequências entre 50 e 60% no sudeste brasileiro, não chega a 5% na região nordeste, sendo a mutação $\beta^+IVS-I-6$ a predominante nas populações investigadas.

Manifestações Clínicas

A produção deficiente de cadeias β durante a eritropoese resulta em anemia. As cadeias α , em excesso, formam agregados instáveis que lesam a membrana e causam a destruição prematura das células, processo que ocorre tanto nos precursores eritróides imaturos (eritropoiese ineficaz), quanto nas células maduras (hemólise). A eritropoiese ineficaz é mediada por apoptose: as células em morte programada sinalizam aos macrófagos e são fagocitadas. As hemácias que chegam à circulação carregam inclusões, majoritariamente constituídas de hemicromos formados pela oxidação das subunidades de cadeias α , que interagem na membrana com as proteínas 4.1, anquirina e espectrina e acabam por levar à hemólise extravascular, principalmente no baço.

Clinicamente, as talassemias β são classificadas em *menor* (heterozigose das formas β^0 ou β^+ , ou traço talassêmico β , onde os indivíduos são geralmente assintomáticos, podendo apresentar anemia em situações como na infância, na gravidez e no estresse); em *maior* (homozigose $\beta^0\beta^0$ ou dupla-heterozigose $\beta^0\beta^+$, também conhecida como anemia de Cooley, ou do Mediterrâneo, que corresponde à anemia grave, com dependência de transfusões sanguíneas regulares); e em *intermediária* (homozigose $\beta^+\beta^+$ ou dupla heterozigose $\beta^0\beta^+$, constituída dos fenótipos clínicos intermediários entre o traço talassêmico e a talassemia *maior*).

Na forma *maior*, há anemia grave, com consequente expansão da eritropoese extramedular e anormalidades ósseas, esplenomegalia, compressão da medula espinhal e retardo do crescimento. A hemólise

intensa ocasiona litíase, úlceras de perna e hipertensão pulmonar. As transfusões sangüíneas crônicas levam ao acúmulo de ferro em tecidos vitais como o coração, o fígado e os rins, e causam a pigmentação escura e metálica da pele, diabetes e outras alterações endócrinas, cirrose, arritmias cardíacas e miopatia, principais causas de morte. Hipercoagulabilidade é também uma complicação. Uma parte dos pacientes pode ainda ser portadora de doenças infecciosas, como possível complicação das transfusões crônicas.

A talassemia β *intermediária* está associada a uma anemia hemolítica de menor gravidade que a acima descrita, com níveis de hemoglobina total entre 7 e 9 g/dL. Aqui, as transfusões sanguíneas, se necessárias, são esporádicas. Com o aumento da idade, algumas complicações, como anormalidades ósseas, retardo do crescimento, infertilidade, sobrecarga de ferro tecidual e hipercoagulabilidade podem também ocorrer, assim como osteoporose e hipertensão pulmonar grave. As complicações trombóticas, por outro lado, são mais freqüentes do que em pacientes com talassemia *maior* regularmente transfundidos.

A talassemia *minor* é geralmente assintomática e associada a anormalidades da morfologia eritrocitária, com uma discreta anemia hipocrômica e microcítica que ocorre mais comumente na infância, na gravidez, ou em situações estresse fisiológico. O diagnóstico do estado heterozigótico da talassemia β é particularmente importante para o aconselhamento genético e para a prevenção de administração iatrogênica de compostos ferrosos aos portadores.

Moduladores Genéticos de Gravidade

A talassemia α é aqui também um modulador genético de gravidade que, como nas síndromes falciformes, melhora a evolução clínica dos pacientes. Por outro lado, o excesso de cadeias α em indivíduos que têm a triplicação ou quadruplicação desses genes tende a influenciar negativamente a progressão clínica da talassemia β , que em heterozigotos simples passa a apresentar-se clinicamente como talassemia intermediária.

Mutações que resultem em níveis mais elevados de HbF podem igualmente contribuir para uma redução da gravidade da doença, enquanto alterações na proteína AHSP parecem produzir um fenótipo talassêmico mais exacerbado.

Diagnóstico

Os heterozigotos da talassemia β ($\beta\beta^0$ ou $\beta\beta^+$) podem ser diagnosticados laboratorialmente pela elevação dos níveis da HbA₂, com ou sem um discreto aumento da concentração de HbF. Eles são indistinguíveis. Já os homozigotos $\beta^0\beta^0$ apresentam somente as hemoglobinas A₂ e F (cerca de 98%), enquanto os homozigotos $\beta^+\beta^+$ e duplos-heterozigotos $\beta^0\beta^+$ possuem uma proporção de HbF, em relação à HbA, que varia de 40 a 70%, a depender do grau de expressão dos alelos β^+ . Como nas demais hemoglobinopatias e em todas as doenças genéticas, o estudo familiar é fundamental.

O diagnóstico molecular tem sido realizado no período pré-natal ou quando se deseja esclarecer as bases moleculares da doença, para fins de aconselhamento genético, por exemplo. Várias técnicas têm sido empregadas para detecção das mutações mais freqüentes, como a análise com enzimas de restrição ou as

plataformas de *microarrays*. Para mutações novas ou raras, o sequenciamento direto dos genes β é o método de escolha. O MLPA pode também ser empregado na investigação de deleções no cluster β , sendo esta uma causa mais rara deste tipo de talassemia.

Tratamento e Prognóstico

A manutenção de níveis mínimos de hemoglobina entre 9,5-10 g/dL requer terapia transfusional regular; como consequência, torna-se necessária a administração de quelantes de ferro, como a desferroxiamina ou outros quelantes orais, acompanhada do monitoramento da sobrecarga de ferro através da medida dos níveis séricos de ferritina, da avaliação do acúmulo de ferro cardíaco por ressonância magnética T2*, e de adequado suporte endócrino.

Embora a desferroxiamina seja ainda o tratamento quelante de escolha, novos agentes vêm sendo testados, como a deferiprona, uma droga de administração oral que penetra na membrana celular e elimina espécies intracelulares tóxicas de ferro. Apesar do relato de alguns efeitos adversos, ela parece ser mais efetiva na remoção do ferro depositado no coração. A associação dessas duas primeiras drogas também vem sendo testada e pode ser uma opção bastante promissora. Ainda, o deferasirox, um quelante oral recentemente aprovado nos Estados Unidos e no Brasil, pode ter eficácia equivalente à da desferroxiamina, embora os efeitos colaterais no longo prazo não sejam ainda conhecidos.

A manipulação do metabolismo de ferro poderá ser, futuramente, uma opção terapêutica importante nas talassemias β . A hepcidina é um pequeno peptídeo, produzido pelo fígado em altas concentrações durante as infecções, que inibe a absorção intestinal de ferro, impedindo assim sua utilização pelos agentes infecciosos. A administração de hepcidina sintética, ou mesmo de agentes que aumentem sua expressão, poderia contribuir para um melhor controle da absorção deste metal. A Figura 4 traz uma representação esquemática dos mecanismos envolvidos na quelação de ferro pelos quelantes mencionados e na ação da hepcidina.

As concentrações de hepcidina normalmente se elevam quando os estoques de ferro estão aumentados. Em pacientes com talassemia *maior* ou *intermediária*, e no modelo de camundongo talassêmico, porém, os níveis dessa proteína estão diminuídos. Tem sido recentemente demonstrado que, nessas condições, há uma maior expressão do fator GDF15, um fator de diferenciação do crescimento pertencente a uma superfamília de moléculas (TGFB) identificadas como regulatórias da expressão de hepcidina. Novamente, a administração deste fator ou de agentes que promovam sua maior expressão, poderia se transformar futuramente em importante recurso terapêutico.

Terapias que pudessem suprimir a expressão dos genes α poderiam auxiliar na redução da gravidade clínica da doença, já que estratégias para aumento da produção de HbF não têm sido bem sucedidas na talassemia β . Mas, para essa finalidade, a regulação da expressão dos genes de globinas precisa ainda ser melhor esclarecida.

Antioxidantes que possam proteger a membrana celular, como as vitaminas C e E, têm também sido testados, ainda sem resultados conclusivos em humanos.

A única possibilidade de cura existente até o momento é o transplante alogênico de células tronco hematopoiéticas de doadores relacionados e HLA-compatíveis. Como nas síndromes falciformes, os melhores resultados estão em pacientes mais jovens, que ainda não acumularam os danos teciduais e orgânicos daqueles com idades mais avançadas.

Como nas DF, a terapia gênica, com transferência do gene β normal para células tronco hematopoiéticas através de vetores virais que se integrem no genoma hospedeiro, e a utilização de RNAs de interferência, para redução da expressão dos genes α e promoção do aumento da expressão dos genes β , vêm sendo testadas *in vitro* e em modelos animais e são possibilidades promissoras para o tratamento e melhor prognóstico da doença.

Referências Bibliográficas

1. Bank A. On the road to gene therapy for beta-thalassemia and sickle cell anemia. *Pediatr Hematol Oncol.* 2008;25:1-4.
2. Costa FF, Sonati MF. Hemoglobina: Estrutura, Síntese e Transporte de Oxigênio. In: Covas DT, Langhi Júnior DM, Bordin JO, editores. *Hemoterapia: Fundamentos e Prática.* São Paulo: Editora Atheneu; 2007. p. 27-33.
3. Fattori A, Costa FF. Defeitos Hereditários das Hemoglobinas – Talassemias Beta. In: Lopes AC (editor), Amato Neto V (co-editor). (Org.). *Tratado de Clínica Médica.* 1ª. ed. São Paulo, Editora Roca Ltda., 2006, vol. II. p. 1938-1942.
4. Frenette PS, Atweh GF. Sickle cell disease: old discoveries, new concepts, and future promise. *J Clin Invest.* 2007;117:850-8.
5. Gladwin MT, Vichinsky E. Pulmonary complications of sickle cell disease. *N. Engl. J. Med.* 2008;359(21):2254-2265. Review.
6. Higgs DR, Weatherall DJ. The Alpha Thalassaemias. *Cell Mol. Life Sci.* 2009;66(7):1154-1162.
7. Higgs DR, Wood WG. Genetic complexity in sickle cell disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2008;105(33):11595-11596.
8. Higgs DR, Wood WG. Long-range regulation of alpha globin gene expression during erythropoiesis. *Curr. Opin. Hematol.* 2008;15(3):176-183. Review.
9. Lobo C. Defeitos Hereditários das Hemoglobinas – Doenças Falciformes. In: Lopes AC (editor), Amato Neto V (co-editor). (Org.). *Tratado de Clínica Médica.* 1ª. ed. São Paulo, Editora Roca Ltda., 2006, vol. II. p. 1919-1932.
10. Madigan C, Malik P. Pathophysiology and therapy for haemoglobinopathies. Part I: sickle cell disease. *Expert Rev Mol Med.* 2006;8:1-23. Review.
11. Moi P, Sadelain M. Towards the genetic treatment of beta-thalassemia: new disease models, new vectors, new cells. *Haematologica.* 2008;93:325-30.
12. Old JM. Screening and genetic diagnosis of haemoglobinopathies. *Scand J Clin Lab Invest.* 2007;67:71-86.

13. Ribeiro DM, Sonati MF. Regulation of human alpha-globin gene expression and alpha-thalassemia. *Genet. Mol. Res.* 2008;7(4):1045-53. Review.
14. Sonati MF, Costa FF. Defeitos Hereditários das Hemoglobinas – Talassemias Alfa. In: Lopes AC (editor), Amato Neto V (co-editor). (Org.). *Tratado de Clínica Médica*. 1ª. ed. São Paulo, Editora Roca Ltda., 2006, vol. II. p. 1932-1938.
15. Sonati MF, Costa FF. The genetics of blood disorders: hereditary hemoglobinopathies. *J. Pediatr.* 2008;84(4 Suppl):S40-51. Review.
16. Steinberg MH, Forget BG, Higgs DR, Nagel RL. *Disorders of Hemoglobin. Genetics, Pathophysiology and Clinical Management*. Cambridge University Press, New York, 2001.
17. Trompeter S, Roberts I. Haemoglobin F modulation in childhood sickle cell disease. *Br. J. Haematol.* 2009;144(3):308-316. Review.
18. Urbinati F, Madigan C, Malik P. Pathophysiology and therapy for haemoglobinopathies. Part II: thalassaemias. *Expert Rev Mol Med.* 2006;8:1-26. Review.
19. Voon HP, Vadolas J. Controlling alpha-globin: a review of alpha-globin expression and its impact on beta-thalassemia. *Haematologica* 2008;93(12):1868-1876.
20. Weatherall DJ, Clegg JB. *The Thalassemia Syndromes*, 4th edn, Blackwell Science, Oxford, 2001.
21. Wenning MRSC, Sonati MF. Hemoglobinopatias Hereditárias. In: Lopes AC, editor. *Diagnóstico e Tratamento*. São Paulo: Editora Manole Ltda.; 2007. p. 310-314.
22. Zago MA, Falcão RP, Pasquini, R, editores. *Hematologia: Fundamentos e Prática*. São Paulo: Editora Atheneu; 2004.



ARTÍCULO ORIGINAL

Molecular characterization of alpha-thalassemia in the Mexican population

Virginia Reyes-Núñez,* Javier Garcés-Eisele,** Susan Jorge,*** Elza Kimura,***
Fernando Ferreira-Costa,**** María de Fátima Sonati,*** Guillermo Ruiz-Reyes*

* Laboratorios Clínicos de Puebla. ** Universidad de las Américas, Puebla. *** Department of Clinical Pathology.
**** Department of Clinical Medicine, School of Medical Sciences, State University of Campinas, Campinas, Brazil.

ABSTRACT

Background. α -Thalassemia (α -Thal) has been poorly characterized at the molecular level in Mexico. **Methods.** 106 consecutive individuals identified in Laboratorios Clínicos de Puebla, with either hypochromia (MCH < 24 pg) and/or microcytosis (MCV < 75 fl in women or < 80 fl in man), without iron deficiency, with or without anemia were investigated in this study, along a 16 month-period. α and β -Thal were looked for, the former were characterized at the molecular level. **Results.** Out of the 106 consecutive cases with hypochromia and/or microcytosis and normal levels of protoporphyrin zinc complex, 48 cases (45.3%) had thalassemia (37 cases of β -Thal and 11 cases of α -Thal), whereas in 58 cases (54.7%) a definite diagnosis could not be established. Of the α -Thal cases, 8 were heterozygous and two were homozygous for the $-\alpha^{3.7}$ deletion, whereas one case was heterozygous for the α^{2Hpb} allele. **Conclusions.** Only few of the α -Thal alleles tested were found, thus the α -thalassemic mutations, present in the studied population, seem to be rather heterogeneous.

Key words. Thalassemia. Anemia. Mexico.

INTRODUCTION

The thalassemias result from deficient synthesis of one or more of the polypeptide chains of the normal human hemoglobin; this primary feature is a quantitative one and contrasts with the qualitative changes of hemoglobin structure that characterize the hemoglobinopathies.¹ Thalassemia is considered one of the most common genetic disorders worldwide: As far as β -Thal is concerned, about 3% of the world's population (180 mi-

Caracterización molecular de talasemia alfa en una población mexicana

RESUMEN

Antecedentes. En México, la α -talasemia (α -Thal) ha sido pobremente caracterizada a nivel molecular. **Métodos.** Se estudiaron 106 individuos consecutivos identificados en los Laboratorios Clínicos de Puebla, con hipocromia (CMH < 24 pg) y/o microcitosis (VCM < 75 fl en mujeres o 80 fl en hombres), sin deficiencia de hierro, con o sin anemia, durante un periodo de 16 meses. Se investigaron α y β -Thal; las primeras fueron caracterizadas a nivel molecular. **Resultados.** De los 106 casos consecutivos estudiados con hipocromia y/o microcitosis, y niveles normales del complejo de protoporfirina-cinc, 48 casos (45.3%) tenían talasemias (37 de ellos β -Thal y 11 α -Thal), mientras que en 58 casos (54.7%) no pudo establecerse un diagnóstico definitivo. De las talasemias α , ocho casos eran heterocigotos y dos homocigotos para la delección $-\alpha^{3.7}$, mientras que sólo un caso resultó heterocigoto para el alelo α^{2Hpb} . **Conclusiones.** De los alelos α -Thal estudiados sólo se encontraron algunos, de lo que se infiere que en la población estudiada esas mutaciones parecen ser bastante heterogéneas.

Palabras clave. Talasemia. Anemia. México.

llion people) carry β -Thal genes,² these genes being particularly prevalent in inhabitants of Italy and Greece, the highest prevalence of the carrier state being found in Sardinia (34%), the delta region of the Po river near Ferrara (20%) and Sicily (10%). The prevalence of the carrier state of β -Thal in Mexico is not low and there are data which suggest that the condition is not infrequent;³⁻⁵ in addition, clusters of the condition in our country with a prevalence of up to 15% have been identified,^{6,7} with data which suggest that β -Thal genes

in some places are autochthonous⁶ and in others imported from the Mediterranean area.⁷ Concerning α -Thal in Mexico, the information is even scantier: α -Thal has been found to be responsible for 1% of the hypochromic microcytic anemias in Mexico, this figure being about one half of that of β -Thal.⁴ The thalassemic syndromes may result in red blood cell hypochromia and/or microcytosis with or without anemia, conditions that can mimic iron-deficiency states.¹ In previous studies, α -Thal alleles ($\alpha^{3.7}$, α^{Hph} , α^{SEA} , α^{FIL}) have only been identified in for individuals.^{8,9} We have analyzed the prevalence of both α and β -Thal in a referral center of patients with hematological diseases. Propositi for α -Thal were further characterized at the molecular level.

MATERIAL AND METHODS

Patients

The blood samples of 106 consecutive individuals identified in Laboratorios Clínicos de Puebla, with either hypochromia (MCH < 24 pg) or microcytosis (MCV < 75 fl in women or < 80 fl in man), without iron deficiency (PPZ < 80 mmol), with or without anemia were prospectively investigated in the study, along a 16 month-period. Written informed consent was obtained in all individuals.

Quantification of Hemoglobin A₂ (HbA₂)

In all samples, the quantification of HbA₂ was performed by ionic exchange column chromatography using the commercial Beta-Thal HbA₂ Quick Column Kit (Helena Laboratories) according to the provided instructions. Levels of HbA₂ above 3.8% were considered as indicative of β -Thal.

DNA extraction

High molecular weight DNA was extracted from the samples remaining after exclusion of β -Thal according to standard protocols.¹⁰

Detection of the α genes mutations

The genotype $-\alpha^{4.2}$ was determined using the primers described in Baysal and Huisman.¹¹ For the detection of the normal allele, 2 μ l of DNA (aprox. 1 μ g) in a final volume of 50 μ l were subjected after denaturation at 95 °C for one min to 35 cycles (15s 94 °C, 20s 65 °C, 20s 72 °C) and a final elongation step of 2 min at 72 °C. The amplification was performed as a hot-start PCR with AmpliWax under the following

conditions: 2U AmpliTaq DNA polymerase (Perkin Elmer), 67 mM Tris/HCl pH 8.8, 16.6 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2 mM MgCl_2 , 10 mM 2-ME, 8% DMSO, 0.1% gelatine, and 0.2 mM of each dNTP. For detection of the amplification products 8 μ l were separated on a 4.5% polyacrylamide gel. The $-\alpha^{4.2}$ allele was amplified with the Expand Long Template DNA Polymerase (Roche Molecular Systems) as a hot-start PCR with AmpliWax using the buffer 3 supplied with the enzyme (50 mM Tris/HCl pH 9.2, 16 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2.25 mM MgCl_2 , and 0.2 mM of each dNTP, temperature profile: 1 cycle: 1 min 95 °C; 10 cycles: 15s 95 °C, 50s 65 °C, 45s 68 °C, 20 cycles: 15s 95 °C, 50s 65 °C, 45s, with 20s increments at each cycle, 68 °C; 1 cycle: 2 min 68 °C). The detection of the genotype $-\alpha^{3.7}$ was performed as outlined by Bergstrom-Jones and Poon.¹² The samples homozygous for $-\alpha^{3.7}$ were confirmed with a 7-deletion multiplex PCR as described by Tan, *et al.*¹³ Additional deletional α -Thal (α^{SEA} , α^{THAI} , $\alpha^{20.5}$, α^{MED} , α^{FIL}) included in this multiplex PCR were also searched for in the remaining samples as indicated. Non-deletional α -Thal (α^{Hph} , α^{Neo} , α^{TSaudi} , α^{Neo}) were screened as described elsewhere.¹⁴ The α^{Hph} mutation was confirmed by direct DNA sequencing with an automated sequencer (3.77ABI, Applied Biosystems, CA, USA), with primers previously described.¹⁵

RESULTS

Overall results

Out of the 106 consecutive cases with either red blood cell hypochromia or microcytosis, without iron deficiency, 48 cases (45.3%) had thalassemia (37 cases of β -Thal and 11 cases of α -Thal), whereas in 58 cases (54.7%) a definitive diagnosis could not be established.

α -thalassemia cases

In this subset of 11 individuals, there were two homozygotes ($-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$) and 9 heterozygotes (8 $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$; 1 $\alpha^{\text{Hph}}\alpha\alpha$). Interestingly, six patients had normal levels of hemoglobin despite the thalassemia.

Undefined cases

In this group of cases, several possibilities can be considered: There are either other types of thalassemias which were not assessed in this study, or patients with other conditions different from iron deficiency or thalassemia leading into either red blood cell microcytosis or hypochromia.

DISCUSSION

The most frequent cause of anemia as the primary complain in the studied population is iron deficiency,⁴ which represents 69.6% of patients;¹⁶ on the other hand, β -Thal represents 6% of all patients studied and treated at this institution.¹⁶

In this large prospective study iron deficiency anemia represented 78.8% of all cases of microcytosis and/or hypochromia, a figure similar to that previously reported¹⁶ in which iron deficiency was found to be responsible for the 69% of patients with hypochromic microcytic anemia. In the present study we have investigated individuals with or without anemia, this criterion probably accounting for the observed differences. We have also found that the thalassemic syndromes account for approximately 10% of cases with red blood cells microcytosis and/or hypochromia and that β -Thal was at least three times more frequent than α -Thal in this group of Mexican mestizos. It is important to mention that other types of α -Thal different from the ones that we have searched for in this paper may account for some additional cases of thalassemia and may also be included in the subset of individuals in which a definite diagnosis could not be established; accordingly, it is possible that we may be underestimating the prevalence of α -Thal in this study. Interestingly, this study does not identify additional alleles to those previously described in the Mexican mestizos,^{8,9} thus we confirm that the α -thalassemic mutations, present in the population studied, seem to be rather heterogeneous.⁹

In a study informed from the United States, there are data showing that the most frequent cause of anemias in the general practice, the "common anemias" is thalassemia, since β - added to α -Thal are more frequent than iron deficiency anemias.¹⁷

In summary, we have found that β and α -Thal are not infrequent in the population studied: they are both less frequent than iron deficiency, but together more prevalent than megaloblastic erythropoiesis as a cause of anemia. Accordingly, the thalassemias should not be considered as exceptional in Mexico, and individuals with red blood cell microcytosis and/or hypochromia, with or without anemia should be screened for thalassemia, prior to labeling them as iron-deficient and offering them, sometimes erroneously, iron supplements.^{4,17}

REFERENCES

1. Ruiz-Reyes G. Hemoglobinopatías y talasemias. In: Ruiz-Argüelles GJ (Ed.). Fundamentos de Hematología, 3ª Ed. México: Editorial Médica Panamericana; 2003, pp: 132-54.
2. Lukens JN. The thalassemias and related disorders: Quantitative disorders of hemoglobin synthesis. In: Lee GR, Foerster J, Lukens J, Paraskevas F, Greer JP, Rodgers GM (editors). Wintrobe's Clinical Hematology. 10th Ed. Baltimore, USA: Williams & Wilkins; 1999, pp. 1405-48.
3. Ruiz-Reyes G. Abnormal hemoglobins and thalassemia in Mexico. *Rev Invest Clin* 1998; 50: 163-70.
4. Ruiz-Argüelles GJ, López-Martínez B, Ruiz-Reyes G. Heterozygous beta-thalassemia: Not infrequent in Mexico. *Arch Med Res* 2001; 32: 293-5.
5. Perea FJ, Magaña MT, Cobián JG, Sánchez-López JY, Chávez ML, Zamudio G, Esparza MA, López-Guido B, Ibarra B. Molecular spectrum of β -thalassemias in the Mexican population. *Blood Cells Mol Dis* 2004; 33: 150-2.
6. Reyes-Cruz G, Ruiz-Reyes G, Hernández-Acasieta M. Identificación de un foco de talasemia beta en Tamiyahua, Veracruz. *Rev Invest Clin* 1990; 42: 189-92.
7. Lisker R, Ruiz-Reyes G, López G, Peral-López AM, Zárate G. Características hereditarias de la población mexicana. Estudio de una comunidad de origen italiano. *Rev Invest Clin* 1966; 18: 11-21.
8. Ibarra B, Perea FJ, Villalobos-Arámbula AR. Alelos talasémicos en mestizos mexicanos. *Rev Invest Clin* 1995; 47: 127-31.
9. Casas-Castañeda M, Hernández-Lugo I, Torres O, Barajas H, Cibrián S, Zamudio G, Villalobos-Arámbula AR, Hermosillo-Bañuelos RM, Perea FJ, Ibarra B. Alpha-thalassemia in a selected population of Mexico. *Rev Invest Clin* 1998; 50: 395-8.
10. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning: A laboratory manual. 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989.
11. Baysal E, Huisman THJ. Detection of common deletion alpha-thalassemia-2 determinants by PCR. *Am J Hematol* 1994; 46: 208-13.
12. Bergstrom-Jones AK, Poon A. Evaluation of a single-tube multiplex polymerase chain reaction screen for detection of common alpha-thalassemia genotypes in a clinical laboratory. *Am J Clin Pathol* 2002; 118: 18-24.
13. Tan ASC, Quah C, Low PS, Chong SS. A Rapid and Reliable 7-Deletion Multiplex Polymerase Chain Reaction Assay for α -Thalassemia. *Blood* 2001; 98: 250-1.
14. Kattamis AC, Camaschella C, Sivera P, Surrey S, Fortina P. Human alpha-thalassemia syndromes: detection of molecular defects. *Am J Hematol* 1996; 53: 81-91.
15. Dode C, Rochette J, Krishnamoorthy R. Locus assignment of human alpha globin mutations by selective amplification and direct sequencing. *Br J Haematol* 1990; 76: 275-81.
16. Ruiz-Argüelles GJ, Ramírez-Cisneros F, Rivadeneira L, Ruiz-Delgado MA, Molina-Alavez A. La frecuencia de las anemias megaloblásticas en la práctica privada en Puebla, México: Experiencia de 17 años. *Medicina Univ* 1999; 1: 165-7.
17. Beutler E. The common anemias. *J Am Med Assoc* 1988; 259: 2433-7.
18. Ruiz-Reyes G. Los síndromes talasémicos no son infrecuentes en la población mexicana y se subdiagnostican y confunden con deficiencias de hierro. *Medicina Univ* 1999; 1: 67-73.

Correspondence and reprint request:

Guillermo Ruiz-Reyes, MD
Laboratorios Clínicos de Puebla.
Díaz Ordaz 808.
72530 Puebla, Pue.
Phone: + (52 222) 243 8100
Fax: + (52 222) 243 8428
gruizr@clinicaruiz.com

Recibido el 27 de junio de 2005.
Aceptado el 17 de enero de 2006.