

**ATLAS CITOLÓGICO DE CONCLUSÃO DO CURSO DE
CITOLOGIA CLÍNICA E LABORATORIAL DA
ACADEMIA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
SÃO JOSÉ DO RIO PRETO – SP**

Tema Citológico: Alterações estruturais dos
eritrócitos na anemia falciforme.

Autora: Denise Silva de Paiva

Período do Curso: Julho de 2011 a Dezembro de 2012

Endereço para correspondência:

e-mail: denisepaiva22@hotmail.com

fone: 64 – 81078081

Anemia Falciforme

A Anemia falciforme é uma doença de caráter genético (autossômica recessiva) que resulta em defeitos na estrutura da hemoglobina (Hb), não obrigatoriamente associados a defeitos em sua síntese. Descrita em 1910 por James B. Herrick (médico americano, 1861-1954) que apresentou o estudo de um único paciente negro no qual identificou as células vermelhas do sangue com formato de foice. A prevalência da doença é de 20-40% entre os africanos tropicais e de 8-10% nos afro-caribenhos e afro-americanos. No Brasil, que reconhecidamente apresenta uma das populações de maior heterogeneidade genética do mundo a maior prevalência da doença ocorre nas regiões Norte e Nordeste.

Indivíduos com anemia falciforme obrigatoriamente herdam uma mutação materna e outra paterna. As mutações herdadas podem encontrar-se em estado homozigótico (SS), ou heterozigótico composto, ou seja, a doença é causada pela herança de HbS em combinação com outro defeito (estrutural ou de síntese) na hemoglobina (SC, SD, SE, S betatalassemia, S alfatalassemia ou S mut rara).

A HbS na forma desoxigenada perde sua complexa estrutura quaternária e adquire uma estrutura primária (polimerização hemoglobínica). A partir da polimerização, a HbS torna-se insolúvel, alterando a forma eritrocitária (que normalmente é um disco bicôncavo) para uma estrutura que lembra uma foice: fenômeno da eritrofalciformação. Os eritrócitos falciformados são fagocitados prematuramente pelo sistema macrofágico, ocasionando anemia hemolítica crônica, geralmente de importante magnitude.

1. Estrutura química da Hemoglobina

Hemoglobina é uma proteína globular e sua principal função é o transporte de oxigênio. Quimicamente é composta pela combinação de uma proteína, a globina, e um grupo tetrapirrólico, o heme (figura 1). A globina

consiste na combinação de dois pares diferentes de cadeias polipeptídicas ($\alpha_2\beta_2$, $\alpha_2\delta_2$ e $\alpha_2\gamma_2$) que caracterizam as três hemoglobinas normais, as HbA, HbA₂ e Hb Fetal, respectivamente. As cadeias polipeptídicas alfa, ou globina alfa, são formadas por 141 aminoácidos cada, enquanto as globinas beta, delta e gama têm 146 aminoácidos cada uma. Desta forma, os tetrâmeros $\alpha_2\beta_2$, $\alpha_2\delta_2$ e $\alpha_2\gamma_2$ têm 574 aminoácidos cada. O heme, por sua vez, é um complexo formado por um átomo de ferro situado no interior da estrutura porfirínica. Esta estrutura é protegida por aminoácidos circundantes que envolvem o grupo heme, protegendo-o da água. Esta proteção garante a estabilidade do ferro no estado ferroso (Fe^{++}), permitindo-o que se ligue com o átomo de oxigênio.

A estabilidade da molécula de Hb é dependente do arranjo estrutural do tetrâmero das duas globinas alfa (α_2) e das duas globinas beta (β_2), ou delta (δ_2), ou gama (γ_2). Em resumo, o tetrâmero que compõe a molécula da Hb A é representado como $\alpha_2\beta_2$, da HbA₂ ($\alpha_2\delta_2$), e da Hb Fetal ($\alpha_2\gamma_2$). Cerca de 75% de cada um dos tetrâmeros tem estrutura química em forma helicoidal e com várias dobraduras (Figura 2). Os 25% da molécula tetramérica das hemoglobinas apresenta-se como estruturas peptídicas não dobradas e seus aminoácidos, por estarem na parte externa da molécula, estabelecem contato com o meio aquoso circundante. Com o auxílio de técnicas de cristalografia molecular em raio X, foi possível conhecer a estrutura espacial da HbA e sua disposição intermolecular efetuada por contatos entre as globinas alfa e beta (figura 3). Assim, a função da hemoglobina como receptora e transportadora de oxigênio está associada aos movimentos de suas subunidades.

O transporte de oxigênio pela hemoglobina está baseado na capacidade de seus átomos de ferro combinarem reversivelmente com o oxigênio molecular, bem como pela eficiência do seu carregamento pelos eritrócitos aos tecidos e órgãos. A liberação de oxigênio ocorre nos pequenos vasos arteriais, com distribuição a diferentes células e tecidos.

2. Aspectos genéticos da estrutura da Hemoglobina

A produção das várias hemoglobinas humanas é controlada por dois grupos de genes estreitamente ligados. Os genes das globinas alfa-símile estão no braço curto do cromossomo 16, entre a banda 13,2 e o telômero, e consistem em dois genes de globina α e uma única cópia do gene zeta. Os genes das globinas não-alfa encontram-se no cromossomo 11, na banda P15, perto do final do braço curto, e consistem em um único gene ϵ nos genes da globina fetal e nos genes delta e beta da globina adulta.

Cada gene contém três blocos de seqüências de nucleotídeos (exons) que codificam o RNA - mensageiro, com duas seqüências interpostas (íntrons). As seqüências laterais em cada extremidade dos genes de globina são importantes na regulação de sua atividade.

A ativação de genes individuais de globina em nível tecidual e no processo de desenvolvimento depende, em parte, de seqüências intensificadoras, localizadas nas laterais 5' e 3' e, possivelmente, nos íntrons dos genes. Diversos fatores de transcrição ligam-se às seqüências promotoras e intensificadoras dos genes da globina.

Cada um destes genes possui características estruturais essenciais para a sua função normal. Incluem a presença de um local "CAP", que marca o início da transcrição do precursor RNAm; códon de início e término apropriadamente localizados, a fim de sinalizar o início e o término da tradução do RNAm maduro; presença de sítios de união do doador (GT) e acceptor (AG) que marcam os pontos no precursor de RNAm onde os íntrons devem ser removidos enquanto os exons são ligados; seqüências de "consenso" circundando os dinucleotídeos do doador e acceptor que formam o sinal de união funcional; e presença de seqüências não traduzidas 5' e 3', cuja importância ainda não foi determinada.

A via de expressão do gene da globina é típica da maioria dos genes eucarióticos. Inicialmente cada gene é transcrito num precursor RNAm. Através do processo de "splicing" os íntrons são removidos, enquanto os exons são unidos. Há a modificação do RNAm na extremidade 5' pela estrutura "5' CAP" e adição de uma cauda poli A. O RNAm agora maduro é transportado do

núcleo para o citoplasma, associa-se a ribossomas, RNA transportador e fatores de iniciação e alongamento protéicos necessários para a tradução. As cadeias de globina recém-sintetizadas combinam-se rapidamente com o heme e entre si para formar tetrâmeros de globina.

O tetrâmero é uma molécula altamente solúvel, enquanto que as cadeias individuais de globina são bastante insolúveis. Para evitar a precipitação das cadeias de globina, é essencial que as globinas alfa e não-alfa sejam sintetizadas em quantidades aproximadamente iguais ou equilibradas.

3. Alterações estruturais dos eritrócitos na anemia falciforme

O gene falciforme resulta de uma mutação pontual que causa a substituição do aminoácido ácido glutâmico na sexta posição da cadeia da beta globina para valina. Essa substituição é devida à alteração na segunda base do códon que codifica o ácido glutâmico, ou seja, GAG para GTG 11,14.(Figura 4 e 5)

Quando o eritrócito contendo Hb SS é submetido a desoxigenação, modifica sua forma de disco bicôncavo para uma célula alongada, em forma de “foice”, devido ao processo de polimerização que ocorre quando a molécula Hb S está em conformação desoxi, formando longos polímeros com alinhamento das fibras e deformação da hemácia (a hemoglobina SS desoxigenada torna-se um gel firme que deforma o formato da hemácia) (Figura 6)

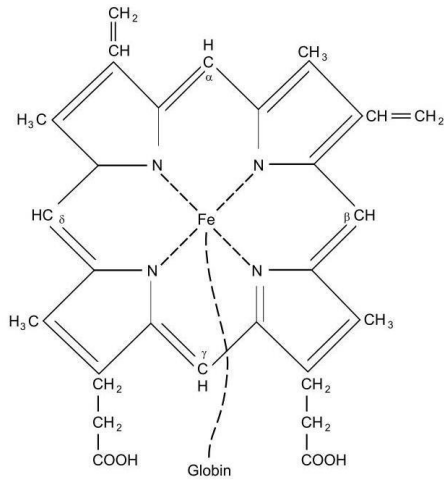
A polimerização da HbS deforma o eritrócito, fazendo com que a célula perca seu formato discóide, tornando-se alongada com filamentos na sua extremidade (Figura 7, 8, 9, e 10). A seqüência que causa a deformação dos eritrócitos discóides em falcizados altera a funcionalidade da bomba de sódio e potássio, com conseqüente perda de potássio e água, tornando os eritrócitos mais densos e favorecendo o aumento de polímeros de HbS. Ocorre, também, a elevação da concentração intracelular de cálcio, pela falência da bomba de cálcio/ATPase e, conseqüentemente, aumenta a concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) da desoxi-HbS.

Todas essas alterações diminuem a capacidade da permeabilidade celular. A contínua alteração da morfologia dos eritrócitos com HbS provoca lesões crônicas da membrana celular, a ponto do eritrócito tornar-se irreversivelmente falcizado, acentuando os problemas não só em nível celular como também em nível circulatório (figura 11). Dentre as alterações da membrana temos os seguintes eventos: rearranjo das proteínas espectrina-actina, diminuição de glicoproteínas, geração de radicais livres, externalização da fosfatidilserina e aceleração da apoptose, devido ao aumento da atividade citosólica de cálcio (Ca^{2+}).

No processo de falcização, em nível celular, as células irreversivelmente falcizadas nos homozigotos HbS (Hb SS) representam entre 4 e 44% do total dos eritrócitos. Assim, os eritrócitos irreversivelmente falcizados formam-se, logo após sua liberação pela medula óssea, e são rapidamente retirados da circulação, 1/3 por hemólise intravascular e 2/3 por fagocitose.

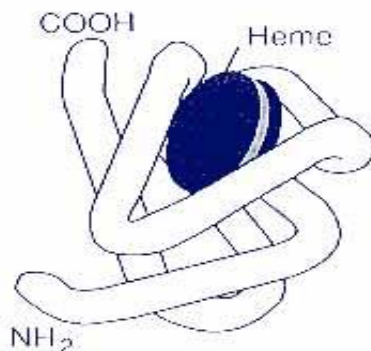
Anexos:

Figura 1



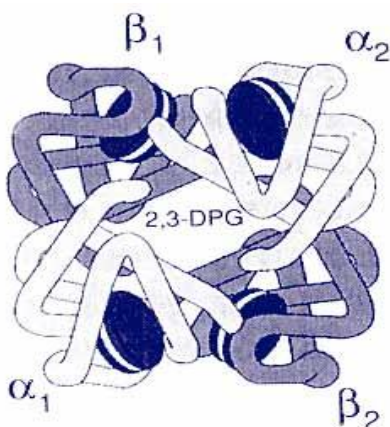
Estrutura da molécula de hemoglobina, proteína de estrutura globular e quaternária composta por quatro cadeias polipeptídicas e o heme – grupo prostético.

Figura 2



A globina, com suas dobraduras, e a inserção do grupo heme.

Figura 3



Esquema da estrutura tetramerizada (duas globinas alfa identificadas por α_1 e α_2 e duas globinas beta: β_1 e β_2) da molécula da HbA ($\alpha_2\beta_2$). A identificação das globinas alfa e beta em α_1 , α_2 , β_1 e β_2 é importante para o entendimento dos contatos de estabilização ($\alpha_1\beta_1$ e $\alpha_2\beta_2$) e de oxigenação ($\alpha_1\alpha_2$ e $\beta_1\beta_2$).

Figura 4

Hemoglobina A	Hemoglobina S
Hb A – $\alpha_2 \beta_2$	Hb S – $\alpha_2 \beta_2^{(6:GLU \rightarrow VAL)}$
▶ G A G	▶ G T G
▶ Ácido glutâmico	▶ Valina
▶ Adenina	▶ timina

Sequencia de DNA da cadeia normal de beta-globina

ATG GTG CAC CTG ACT CCT GAG GAG AAG TCT GCC GTT ACT GCC CTG TGG GGC AAG GTG AAC GTG GAT GAA
Val His Len Thr Pro Gln Gln Lys Ser Ala Val Thr Ala Len Trp Gly Lys Val Asn Val Asp Gln

Sequencia de DNA da cadeia mutada da beta-globina (hemoglobina S)

ATG GTG CAC CTG ACT CCT GTG GAG AAG TCT GCC GTT ACT GCC CTG TGG GGC AAG GTG AAC GTG GAT GAA
Val His Len Thr Pro Val Gln Lys Ser Ala Val Thr Ala Len Trp Gly Lys Val Asn Val Asp Gln

Figura 5

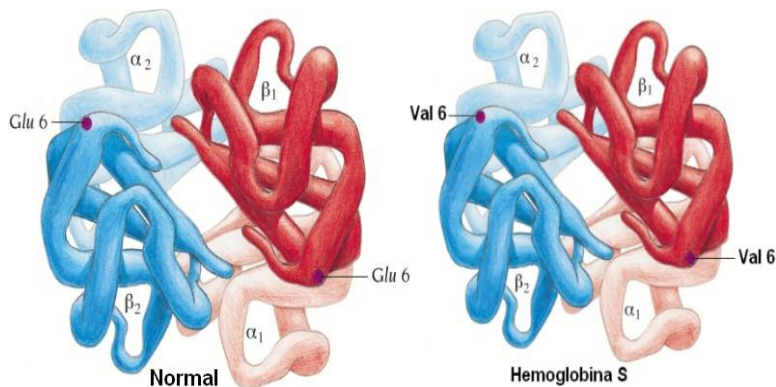
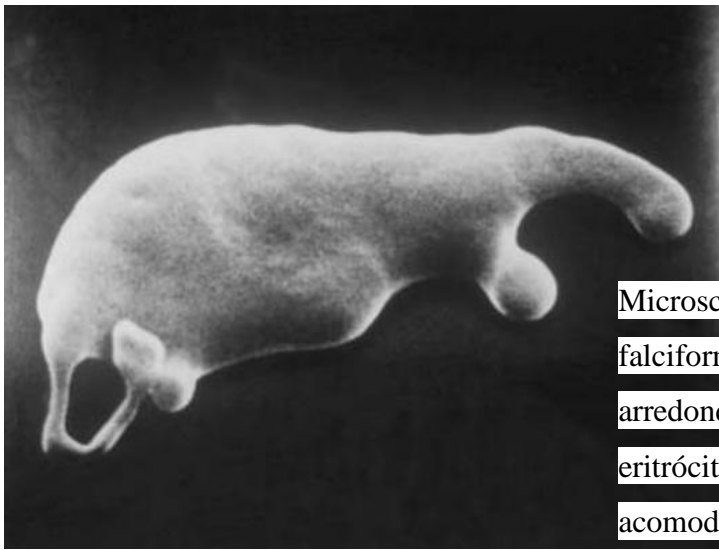


Figura 6



Microscopia eletrônica de eritrócitos com oxi-HbS, e eritrócito com oxi-HbA. Os eritrócitos com oxi - HbS apresentam escavações em suas membranas causadas por múltiplas lesões durante os processos de oxidação, polimerização e degradação da Hb S. O eritrócito com oxi-HbA apresenta-se com a morfologia discóide normal.

Figura 7



Microscopia eletrônica da célula falciforme. Observar as projeções arredondadas que indicam as regiões do eritrócito falcêmico em que estão acomodados os corpos de Heinz.

Figura 8



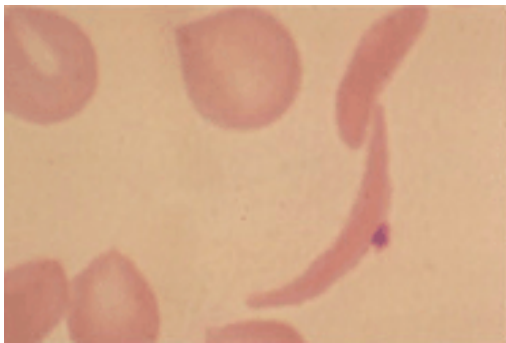
Observação microscópica de eritrócitos normais e drepanócitos, com as extremidades afiladas

Figura 9



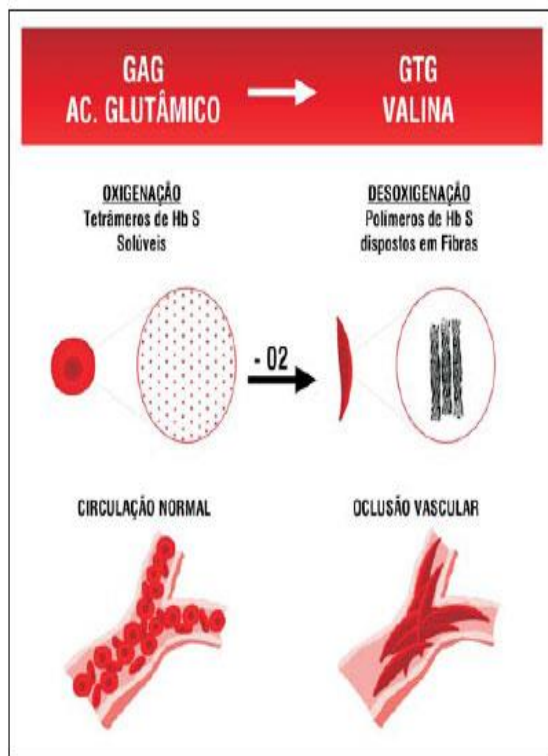
Microscopia eletrônica mostrando eritrócito normal e drepanócito à direita

Figura 10



Observação microscópica de eritrócitos normais e drepanócitos, com as extremidades afiladas

Figura 11



Esquema didático sobre como a deformação eritrocitária interfere na circulação sanguínea.

Referências

- 1.** Protocolo de doença falciforme Ministério da Saúde
http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/pcdt_doenca_falciforme_livro_2010.pdf
- 2.** Fisiopatologia da anemia falciforme do Conselho Federal de Farmácia
<http://www.cff.org.br/sistemas/geral/revista/pdf/10/infa03.pdf>
- 3.** Anemia falciforme – Genética – UFCSPA
<http://genetica.ufcspa.edu.br/seminarios%20textos/AnemiaFalciforme.pdf>