

METABOLISMO DO GRUPO HEME*

Introdução

A formação da bilirrubina depende da biossíntese e degradação dos grupos heme, presentes principalmente nas hemácias. A duração média de vida de uma hemácia depende da espécie animal: caninos e humanos 120 dias; felinos 70 dias; suínos 65 dias; equinos 150 dias; bovinos 160 dias; ovinos e caprinos 100 dias. Assim, as hemácias são fagocitadas pelo sistema retículo endotelial (fígado, baço e medula óssea) para posterior degradação da hemoglobina, liberando os grupos heme.

As porfirinas atuam como compostos intermediários na biossíntese do heme formadas pelo encontro de uma molécula de succinil-CoA e uma molécula de glicina em organismos animais. Nos vegetais, ao invés da glicina, ocorre a união de uma molécula de succinil-CoA e uma molécula de glutamato. A inserção de um átomo de ferro no interior da porfirina gera um grupo heme. Nas plantas, a inserção de um átomo de magnésio no interior de uma porfirina forma a clorofila, pigmento verde.

Alguns erros na biossíntese do heme podem ocorrer, denominados porfirias, assim como, o acúmulo dos produtos de degradação desse composto (bilirrubina) provoca hiperbilirrubinemia e icterícia. Nestes últimos, a mensuração da bilirrubina total e suas frações, direta e indireta são essenciais para o diagnóstico. Os valores de referência variam amplamente conforme as espécies.

Biossíntese do grupo heme

As porfirinas são compostos tetrapirrólicos cíclicos que atuam como intermediários na biossíntese do grupo heme. As mais importantes na natureza são uroporfirina, coproporfirina e protoporfirina, esta última forma o grupo heme. As porfirinas formam compostos metabólicos importantes para o organismo, sendo a maioria delas, associadas a íons metálicos, chamadas metaloporfirinas. Esses compostos possuem quatro anéis heterocíclicos (I, II, III, IV) que estão ligados entre si por grupos meteno (-CH=) conforme ilustrado na Figura 1. As porfirinas encontradas na natureza são compostos em que, nas várias cadeias laterais são substituídas por oito átomos de hidrogênio

*Seminário apresentado pela aluna LUCIELE VARASCHINI TEIXEIRA na disciplina BIOQUÍMICA DO TECIDO ANIMAL, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, no primeiro semestre de 2010. Professor responsável pela disciplina: Félix H. D. González.

numerados por núcleo de porfina. Nas plantas, ao invés do átomo de ferro, a clorofila contém um átomo central de magnésio, mantendo a mesma estrutura porfirínica.

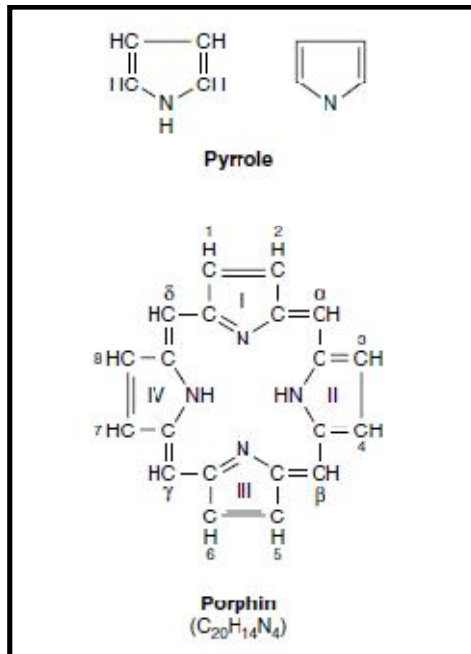


Figura 1. Molécula da porfirina formada por quatro anéis pirrólicos (I, II, III, IV) intercalados por grupos meteno.
Fonte: Harper's Illustrated Biochemistry, cap. 32, p. 271, 2003.

A primeira reação para a síntese do grupo heme ocorre na mitocôndria pela união de uma molécula de succinil-CoA e uma molécula de glicina através da reação catalisada pela enzima aminolevulinato sintetase (ALA sintetase). Esta reação gera aminocetoadipato, que é então descarboxilado a aminolevulinato (nas plantas, algas e na maior parte das bactérias, o aminolevulinato é formado a partir do glutamato e não da glicina). Assim, esta etapa constitui o passo limitante para a biossíntese do heme.

Logo, o aminolevulinato é transportado para o citosol havendo dimerização catalisada pela enzima ALA desidratase (também chamada porfobilinogênio sintetase) para produzir porfobilinogênio. Após, ocorre a condensação de quatro moléculas de porfobilinogênio para produzir o intermediário preuroporfirinogênio. A enzima que catalisa esta condensação é a porfobilinogênio desaminase (PBG desaminase), também chamada uroporfirinogênio I sintetase. O preuroporfirinogênio terá dois destinos: isômeros I e III do uroporfirinogênio. O isômero I é uma molécula não metabolizável e o isômero III se forma pela ação conjunta da uroporfirinogênio sintetase e da

uroporfirinogênio III cosintase. O uroporfirinogênio é descarboxilado pela enzima uroporfirinogênio descarboxilase e no produto resultante há substituição de grupos acetil por grupos metil, passando a ser chamado de coproporfirinogênio. O coproporfirinogênio III é o intermediário mais comum na síntese do heme.

O coproporfirinogênio III é transportado novamente para o interior da mitocôndria, onde dois grupos propiônicos são descarboxilados passando a grupos vinil por ação da coproporfirinogênio oxidase. O produto desta reação é o protoporfirinogênio IX, um composto incolor. Logo, este é convertido em protoporfirina IX pela protoporfirinogênio IX oxidase. A etapa final da síntese do heme envolve a inserção de um átomo de ferro no anel tetrapirrólico catalisada pela enzima ferroquelatase. A figura 2 ilustra a biossíntese do grupo heme.

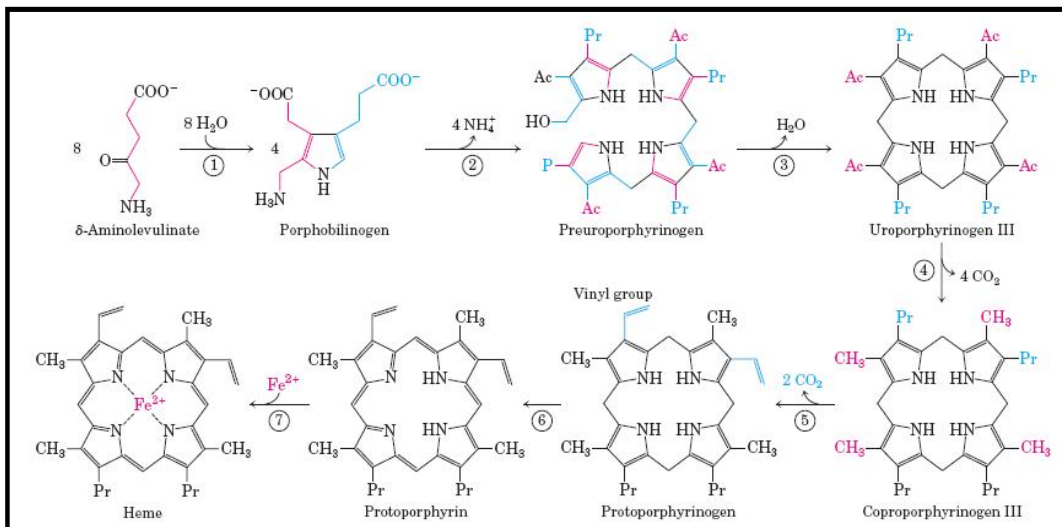


Figura 2. Biossíntese do heme apresentando as reações e respectivas enzimas. 1 Porphobilinogênio sintetase; 2 Uroporfirinogênio sintetase; 3 Uroporfirinogênio III cosintase; 4 Uroporfirinogênio descarboxilase; 5 Coproporfirinogênio oxidase; 6 Protoporfirinogênio oxidase; 7 Ferroquelatase. Fonte: Lehninger Principles of Biochemistry, cap. 22, p. 855, 2004.

O grupo heme é produzido em todos os tecidos animais, principalmente na medula óssea e fígado. A existência deste composto é importante para o transporte de oxigênio, pois está presente principalmente na hemoglobina (80%), mioglobina e enzimas (catalase, citocromo P450 e peroxidases). A citocromo P450 participa no metabolismo hepático de diversas substâncias, tornando-as de mais fácil eliminação. Existem alterações genéticas na biossíntese do heme que podem levar ao acúmulo de intermediários da via, causando uma série de doenças conhecidas como porfirias. Esses

defeitos genéticos causam, por exemplo, aumento na atividade da ALA sintetase ou uma diminuição na atividade da uroporfirinogênio I sintetase, originando a porfiria aguda intermitente (mais comum), que é diagnosticada pelo aumento da excreção do porfobilinogênio na urina. Nesta condição não há mudança de coloração na urina, pois esse composto é incolor. Outro exemplo é a protoporfiria eritropoiética, em que a uroporfirinogênio III sintetase está em déficit na medula óssea. Como resultado há elevação de uroporfirinogênio I e de seus produtos de oxidação (coloração avermelhada), que são encontrados na urina e depositados em uma grande variedade de tecidos, incluindo dentes e ossos.

Catabolismo do grupo heme

A maior parte dos grupos heme provém das hemácias senescentes, que são capturadas pelo sistema retículo endotelial e sofrem degradação enzimática. No organismo humano cerca de 1 a 2 milhões de hemácias são destruídas por hora, gerando 6 gramas de hemoglobina para degradação e posterior formação de 300 miligramas de bilirrubina por dia.

A hemoglobina é degradada em globina e grupos heme, onde a primeira é quebrada e transformada em aminoácidos para reutilização no organismo e, o segundo é fagocitado principalmente no fígado, baço e medula óssea, até a formação de bilirrubina. O átomo de ferro é carregado pela ferritina na circulação sanguínea e reutilizado para formação de outros grupos heme.

A degradação do heme ocorre com a abertura do anel de tetrapirrol da porfirina pela ação da enzima heme oxigenase, onde há quebra da ponte metenil entre os pirróis I e II. Nesta reação ocorrem duas oxigenações e o NADPH, com seu poder redutor, libera Fe^{2+} , CO e biliverdina, um pigmento verde. Tem sido estimado que mais de 86% do monóxido de carbono endógeno é derivado da quebra enzimática do heme, e a quantidade de monóxido de carbono respiratório tem sido usada como um mensurador indireto da produção de bilirrubina.

Logo, através da enzima biliverdina redutase ocorre a formação de bilirrubina. Essa enzima adiciona um hidrogênio fornecido pelo NADPH reduzindo a dupla ligação entre os pirróis III e IV. O pigmento amarelo formado será carregado até o fígado pela albumina, onde será posteriormente conjugado e excretado. Em muitos mamíferos a

atividade da biliverdina redutase hepática é suficiente para esta conversão e normalmente não há limite para a formação da bilirrubina. No entanto, a quantidade desta enzima é muito baixa em aves, conseqüentemente, a biliverdina é encontrada em maior quantidade na bile. A biliverdina também se encontra elevada na bile de coelhos (70%). A figura 3 ilustra a degradação do heme e formação da bilirrubina.

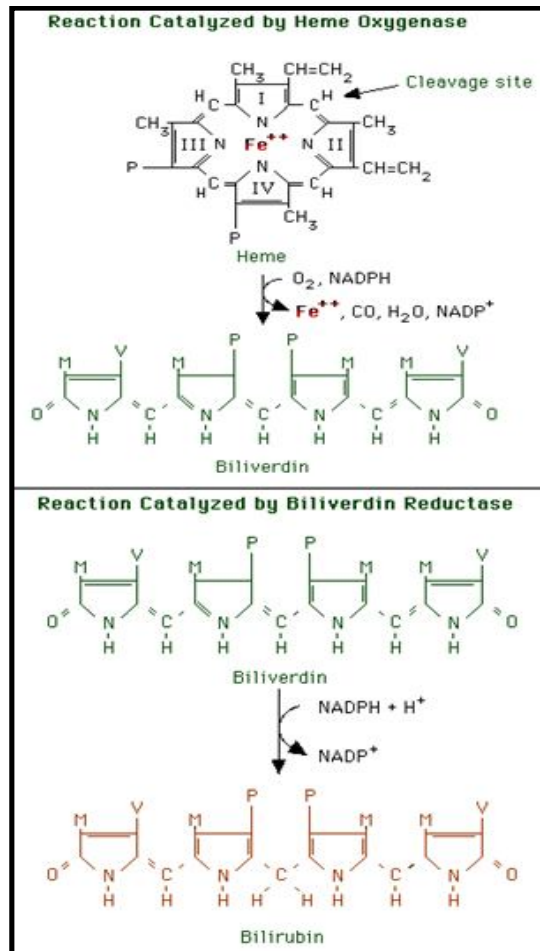


Figura 3. Reações de catabolismo do grupo heme e formação da bilirrubina. Fonte: <http://library.med.utah.edu/NetBiochem/images/hemeorxn.gif>

Conjugação da bilirrubina

A bilirrubina é uma molécula apolar, lipofílica e insolúvel no plasma sanguíneo, também chamada bilirrubina livre. Consiste em um tetrapirrol linear formado por dois dipirrometenos assimétricos conectados por uma ponte de metileno (Figura 4). Cada grupo dipirrólico possui uma cadeia lateral carboxietil, que atua na polaridade, solubilidade e ionização deste pigmento; no entanto, como possui uma forma totalmente protonada, as ligações de hidrogênio estabilizam a molécula em uma conformação rígida que se assemelha a um livro dobrado, onde cada dipirrometeno constitui uma folha do livro. Logo após sua formação se liga a albumina e é carregada até o fígado, onde ocorrerá sua conjugação com o ácido glicurônico. A bilirrubina conjugada é uma molécula polar, solúvel nos líquidos corporais e hidrofílica (Figura 5).

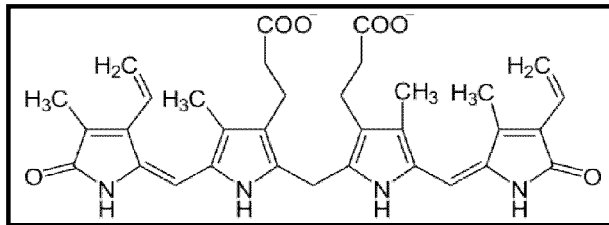


Figura 4. Fórmula estrutural da bilirrubina livre.
Fonte: <http://pt.wikipedia.org/wiki/Bilirrubina>

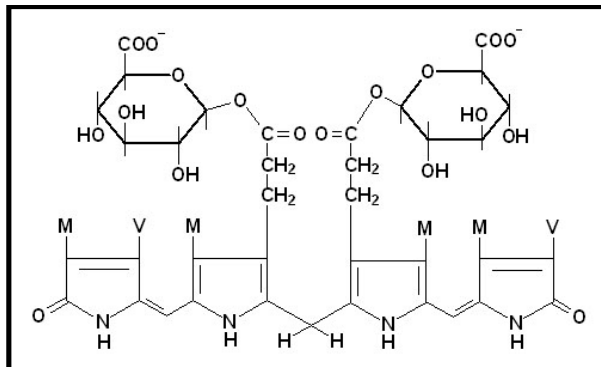


Figura 5. Fórmula estrutural da bilirrubina conjugada ou diglicuronídeo. Fonte: <http://www.mundodeodio.es/wp-content/uploads/2010/04/bilirubindiglicuronide.jpg>

A bilirrubina entra pela face sinusoidal dos hepatócitos por difusão facilitada, ligando-se à ligandina, uma grande proteína citosólica que tem tanto função de

transporte quanto de detoxificação, aumentando a sua solubilidade no citosol. Uma molécula de uridina-difosfato-glicose (UDP-glicose) é transformada em UDP-glicuronato através da enzima UDP-glicose desidrogenase. O UDP-glicuronato se liga a bilirrubina, formando o composto bilirrubina diglicuronídeo, reação catalisada pela bilirrubina-UDP-glicuroniltransferase. Por último, a bilirrubina conjugada sai dos hepatócitos para os canalículos biliares por transporte ativo primário, entra no ducto biliar e é armazenada na vesícula biliar (bile), para posterior excreção no duodeno. A bilirrubina conjugada é o principal componente da bile (Figura 6).

Embora o fígado seja o principal sítio de conjugação e excreção da bilirrubina, vias alternativas têm sido demonstradas. Nos animais normais estes mecanismos alternativos são de menor importância mas, em animais com doença hepática tornam-se importantes. Os rins e o intestino são, experimentalmente, sítios capazes de conjugar a bilirrubina.

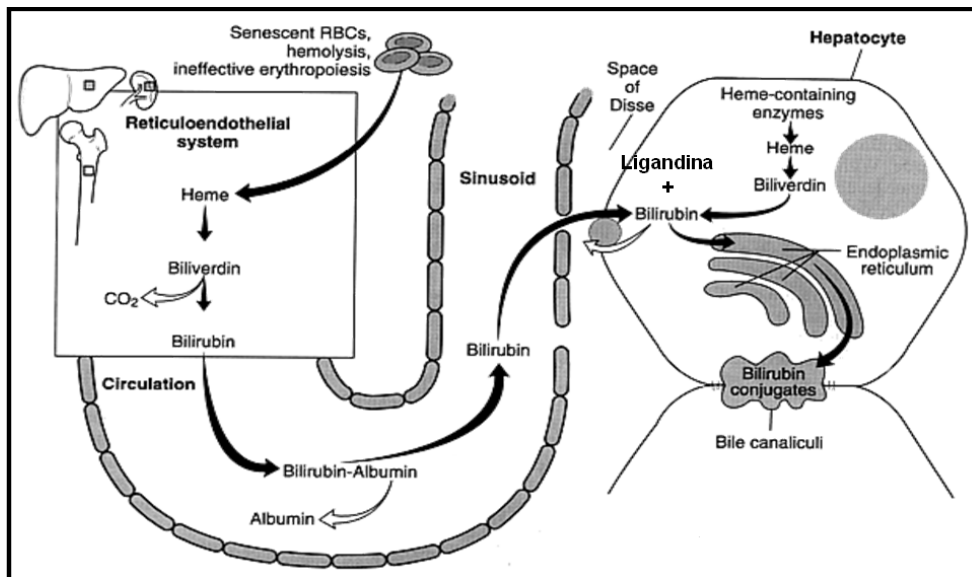


Figura 6. Mecanismo de conjugação da bilirrubina. Fonte: <http://www.hepcentro.com.br/images/Bilirrubin.gif>

Excreção da bilirrubina

Armazenada na vesícula biliar, a bilirrubina conjugada é então excretada no duodeno (bile), mas sua melhor absorção ocorre no intestino grosso, onde é reduzida a uma série de derivados incolores, chamados estercobilinogênios. A reação é catalisada por desidrogenases bacterianas anaerobicamente no cólon. O ácido glicurônico é removido

por ação de enzimas bacterianas específicas (glicuronidases), enquanto o pigmento é reduzido a urobilinogênio. Em animais que não possuem microrganismos intestinais para esta etapa, a bilirrubina passa inalterada e é excretada nas fezes, não ocorrendo a formação de urobilinogênio. A maioria do urobilinogênio formada no intestino é excretada nas fezes (estercobilina). Uma pequena parte é reabsorvida para a circulação portal e reexcretada na bile. Uma pequena fração (1 a 5%) do urobilinogênio volta para a circulação geral (via ciclo entero-hepático) e é excretado pelo rim (urobilina). No cão esta fração excretada pelo rim passa por filtração e secreção tubular, contribuindo para a acidez da urina (Figura 7).

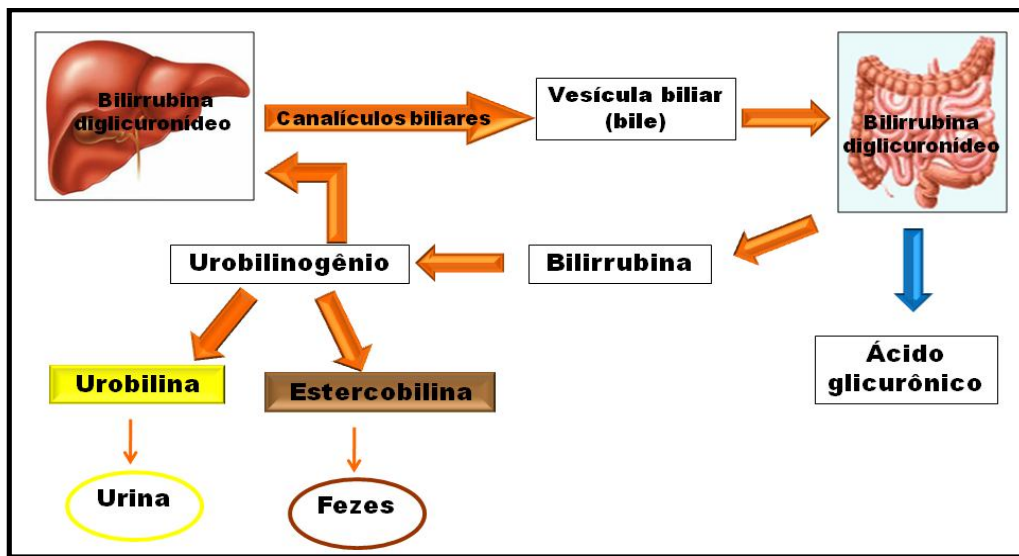


Figura 7. Esquema ilustrando a excreção da bilirrubina e do urobilinogênio.

Hiperbilirrubinemia

Sob condições normais a taxa de produção sistêmica de bilirrubina é equivalente a taxa de captação hepática, conjugação e excreção biliar. No entanto, a hiperbilirrubinemia ocorre quando a taxa de produção é maior do que a de excreção. A icterícia é o aparecimento do pigmento amarelo nos tecidos, resultante da hiperbilirrubinemia. Esta anormalidade pode ter várias causas, dividindo-se basicamente em pré-hepática, hepática e pós-hepática (Tabela 1).

Tabela 1. Tipos de icterícias relacionadas a algumas enfermidades

Tipo de icterícia	Enfermidades associadas
Pré-hepática	Anemia hemolítica, hemólise intravascular, icterícia neonatal (humanos)
Hepática	Deficiência de glicuronil transferase, hepatite, tumores hepáticos
Pós-hepática	Obstrução de ductos biliares, cálculos biliares, tumores biliares

Na maioria das espécies domésticas a hiperbilirrubinemia ocorre quando o valor plasmático máximo é ultrapassado, em média 2,0 mg/dL. Primeiramente, o pigmento amarelo é observado na urina para depois atingir o plasma. Em uma maior concentração atinge os tecidos, principalmente mucosas e escleras (Figura 8).

A bilirrubina encontrada na urina está essencialmente na forma conjugada por ser hidrofílica, entretanto, quando a bilirrubina livre (lipofílica) está elevada, provoca toxicidade em vários órgãos, incluindo o sistema nervoso central, conhecido por kernicterus. Esta enfermidade é rara, com maior ocorrência em neonatos humanos. Contudo, a bilirrubina na sua concentração ideal é tida como um ótimo antioxidante nos tecidos.



Figura 8. Icterícia em equino (esclera), felino e canino (mucosa oral).

Fontes:

<http://cal.vet.upenn.edu/projects/poison/plants/slides/1077lg.jpg>,

http://www.marvistavet.com/assets/images/icterus_cat.gif,

<http://davidbessler.files.wordpress.com/2008/07/221338346.jpg>

Mensuração da bilirrubina e valores de referência para espécies domésticas

A mensuração da bilirrubina plasmática fornece um índice quantitativo da severidade da icterícia. Quando acompanhada de outros testes, pode ser definida a causa da icterícia. Para a

determinação da bilirrubina a amostra preferencial é o soro isento de hemólise, lipemia e protegido da luz; entretanto, pode-se também utilizar o plasma com heparina tomando-se os mesmos cuidados citados anteriormente.

A bilirrubina foi detectada pela primeira vez em 1883 por Erlich, em reação com o ácido sulfanílico diazotado, em amostras de urina. Van den Bergh e Snapper demonstraram a presença de bilirrubina no soro sangüíneo pelo emprego do diazo - reagente de Erlich e álcool como aceleradores. Os métodos existentes determinam a fração que produz cor com a reação de Van den Bergh em solução aquosa (bilirrubina direta), enquanto a fração que desenvolve cor com o álcool é chamada bilirrubina indireta. A reação direta ocorre com a bilirrubina conjugada (diglicuronídeo) solúvel em água. Por outro lado, a reação indireta se processa com a bilirrubina não conjugada, insolúvel em água, mas que se dissolve em álcool para acoplar o reagente diazo. A bilirrubina total compreende a soma das frações conjugada e não-conjugada. Atualmente, nos laboratórios clínicos ocorre uma série de ajustes técnicos para que os resultados sejam mais precisos, diminuindo a ação de interferentes.

Nas espécies domésticas os valores de referência são muito variados, dependentes da anatomia e fisiologia corporal. A tabela 2 apresenta alguns valores de referência das bilirrubinas.

Tabela 2. Valores de referência (mg/dL) das bilirrubinas total, indireta e direta nas diferentes espécies domésticas (Fonte: Kaneko, 2008)

Tipo de bilirrubina	Canino	Felino	Bovino	Equino	Ovino	Caprino	Suíno
Total	0,1 – 0,5	0,15 – 0,5	0,01 – 0,5	1,0 – 2,0	0,1 – 0,5	0 – 0,1	0 – 1,0
Indireta	0,01 – 0,49		0,03	0,2 – 2,0	0 – 0,12	0 – 0,1	0 – 0,3
Direta	0,06 – 0,12		0,04 – 0,44	0 – 0,4	0 – 0,27		0 – 0,3

Conclusão

O entendimento dos processos metabólicos torna-se importante, principalmente na medicina veterinária, devido às diferentes espécies animais. Embora o metabolismo da bilirrubina seja semelhante nos mamíferos, sempre há uma particularidade entre as espécies. Isto é visto comparando-se os valores de referência citados neste trabalho.

A mensuração das bilirrubinas, principalmente indireta e direta direciona o clínico para o provável diagnóstico, visto que o aumento da primeira ou da segunda, ou de ambas está presente em diversas enfermidades.

Referências bibliográficas

- BERG, J.M.; TYMOCZKO, J.L.; STRYER, L. **Biochemistry**, 6.ed. New York: W. H. Freeman, 2006. 1120p.
- BRODERSEN, R. Bilirubin solubility and interaction with albumin and phospholipid. **Journal of Biological Chemistry**, v. 254, n. 7, p. 2364-2369, 1979.
- GONZÁLEZ, F.H.D.; SILVA, S.C. **Introdução à bioquímica clínica veterinária**. 2ª ed. Porto Alegre: Editora da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2006. 358 p.
- JARAMILLO, A.D.A.; QUINTERO, P.A.M.; SALAZAR, L.S.; SIBAJA, M.A. Bilirrubina: un pigmento animal. **Revista Cultura del Cuidado Enfermería**, v. 5, n. 1, p. 100-105, 2008.
- KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**, 6.ed. San Diego: Academic Press, 2008. 1000p.
- KAPLAN, D.; NAVON, G. Nuclear magnetic resonance studies of the conformation of bilirubin and its derivatives in solution. **Journal of Chemical Society**, v. 2, p. 1374-1383, 1981.
- KERR, M.G. **Veterinary Laboratory Medicine – Clinical Biochemistry and Haematology**, 2.ed. Iowa: Blackwell Science, 2002. 368p.
- MURRAY, R.K.. Porphyrins & Bile Pigments. In: MURRAY, R. K; GRANNER, D. K; MAYES, P. A; RODWELL, V. W. **Harper's Illustrated Biochemistry**. London: Prentice-Hall International Inc., 2003. Cap. 32, p. 270-275.
- NELSON, D.L.; COX, M.M.; LEHNINGER, A.L. **Lehninger - Principles of Biochemistry**, 4.ed. New York: W. H. Freeman, 2004. 1100p.
- OSTROW, J.D.; TIRIBELLI, C. Bilirubin, a curse and a boon. **GUT International Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 52, p. 1668-1670, 2003.