



# TRIAGEM DE COMPOSTOS PARA AUMENTO DA AFINIDADE HEMOGLOBINA-OXIGÊNIO COM FINS TERAPÊUTICOS

**Palavras-Chave:** VOXELOTOR, AFINIDADE HEMOGLOBINA-OXIGÊNIO, HIPOXEMIA

**Autores:**

**DIOGO GRANGNANI LOPES, FCM - UNICAMP**

**THAIS TRAINA JORGE, FCM - UNICAMP**

**Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. SUSAN ELISABETH DOMINGUES COSTA JORGE (orientadora), FCM - UNICAMP**

---

## INTRODUÇÃO:

A afinidade da hemoglobina (Hb) pelo oxigênio pode ser modulada por uma variedade de fatores como pressão de O<sub>2</sub> (PO<sub>2</sub>), H<sup>+</sup>/CO<sub>2</sub> (Efeito Bohr) e presença de 2,3-bifosfoglicerato (2,3-BPG). Condições patológicas que causam hipoxemia, como na Síndrome da Angústia Respiratória Aguda (SARA - inflamação pulmonar aguda) são caracterizadas por diminuição da captação de oxigênio e pH reduzido, dificultando a ligação Hb-O<sub>2</sub>. O uso de compostos que aumentam a afinidade Hb-O<sub>2</sub> podem ser uma alternativa terapêutica para doenças pulmonares que cursam com baixa oxigenação, melhorando o oxigênio pulmonar captado pela hemoglobina. Este estudo tem como objetivo investigar os efeitos de compostos, mais especificamente 5-hidroxiacetilfurfural (5-HMF) e Voxelotor na HbA, com foco nos valores de P<sub>50</sub> e constante de Hill nos pHs 6,5, 7,0 e 7,5 para avaliar a afinidade Hb-O<sub>2</sub>, cooperatividade heme-heme e efeito Bohr. Também foi realizada a triagem de novos compostos que pudessem se ligar a uma região de interesse na Hb que tivessem o mesmo efeito.

## MATERIAIS E MÉTODOS:

Utilizou-se sangue total isolado de amostras de sangue periférico de 3 voluntários adultos saudáveis, sem doenças hematológicas, que consentiram sua participação no estudo e assinaram o

TCLE (CAAE 62849022.5.0000.5404). A Hb foi separada e purificada por cromatografia de exclusão molecular em colunas de Sephadex 25G (Sigma-Aldrich; Missouri, USA) em tampão Hepes 50mM (Sigma-Aldrich; Missouri, USA) e por cromatografia de troca iônica (Amberlite MB3; Sigma-Aldrich; Missouri, USA) para remover moléculas e sais residuais. Obteve-se Curvas de Dissociação de Oxigênio (CDO) por espectrofotometria (DU 800, Beckman Coulter-Fullerton, EUA) na temperatura de 25°C, 70µM de Hb e relação estequiométrica Hb:compostos de 1:1.5 (Voxelotor ou 5-HMF). Também realizou-se experimentos na presença de Inositol Hexafosfato (IHP, Sigma-Aldrich) 1mM como mimético do 2,3-BPG. A afinidade de oxigênio foi determinada com a obtenção de P50 (pressão parcial de O<sub>2</sub> necessária para saturação de 50% da Hb total). A Cooperatividade heme-heme foi calculada pela constante de Hill (n), em que n=1 indica interação não cooperativa e n=2 indica interação heme-heme cooperativa. Os experimentos foram realizados nos pHs 6,5, 7,0 e 7,5 para avaliação de Efeito Bohr, em duplicata experimental.

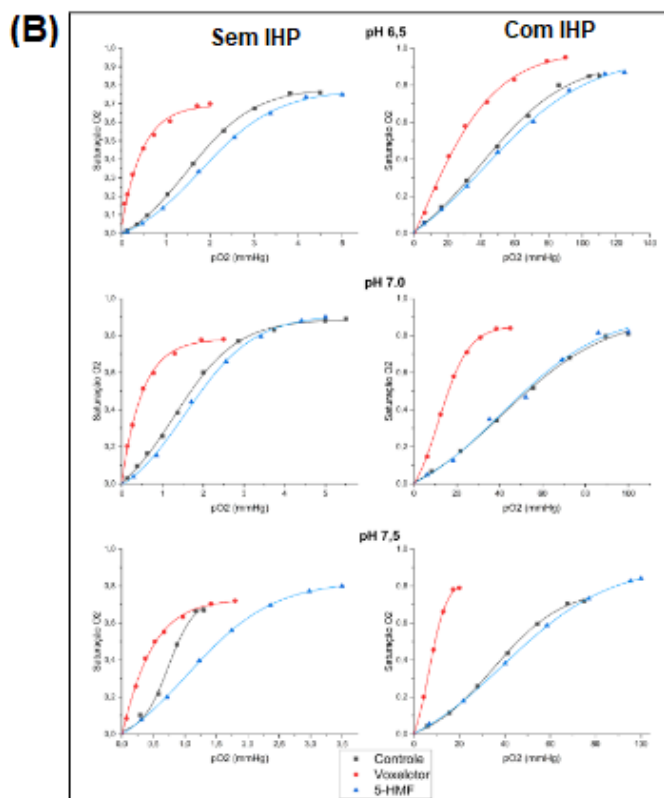
## RESULTADOS:

O Voxelotor aumentou significativamente a afinidade pela Hb nos pHs 6,5 (p=0.004) e 7,0 (p=0.0104) em comparação a stripped HbA (controle) e em todos os pHs em comparação com 5-HMF (p=0.0448, p=0.0109 e p=0.0047). As amostras com 5-HMF não tiveram alterações comparado com o controle. Na presença de IHP, houve diferença significativa de P50 nas amostras com Voxelotor em todos os pHs (6,5 p= 0.0038, 7,0 p= 0.043 e 7,5 p=0.0007), demonstrando mudança significativa no alosterismo proteico e efeito Bohr positivo. Foi observada também diferença significativa entre 5-HMF e Voxelotor em pH 7,0 (p=0.0275) - figura 1.

Em relação à cooperatividade heme-heme, o Voxelotor apresentou valores de n abaixo de 1 para HbA stripped, indicando uma ligação não cooperativa, semelhantemente às mioglobinas. Diferenças significativas nos valores de n foram observadas entre Voxelotor e controle nos pHs 6.5 (p=0.0114) e 7.0 (p=0.0331), e entre Voxelotor e 5-HMF em todos os pHs (p=0.0047, p=0.026 e p=0.0248, respectivamente). Na presença de IHP, não foram encontradas diferenças significativas na cooperatividade heme-heme entre os grupos, e os valores de n foram aproximadamente 2, indicando que a ligação de Hb-O<sub>2</sub> permaneceu cooperativa e sensível à ligação de fosfatos orgânicos, como o IHP - tabela 1.

O screening de novos compostos não identificou nenhum outro composto, além dos já descritos na literatura, capaz de ligar-se à Hb para aumento de sua afinidade ao O<sub>2</sub>.

(A) Amostra	pH	Valor de p50 e DP
Hb <i>stripped</i>	6,5	1,99 ± 0,18
	7	1,71 ± 0,25
	7,5	0,96 ± 0,11
IHP	6,5	49,24 ± 6,73
	7	53,65 ± 14,18
	7,5	41,85 ± 12,78
5-HMF	6,5	2,64 ± 0,53
	7	1,93 ± 0,14
	7,5	1,56 ± 0,15
5-HMF + IHP	6,5	52,07 ± 9,96
	7	50,25 ± 9,08
	7,5	48,90 ± 12,14
Voxelotor	6,5	0,53 ± 0,06
	7	0,44 ± 0,08
	7,5	0,63 ± 0,22
Voxelotor + IHP	6,5	25,32 ± 1,30
	7	15,97 ± 1,47
	7,5	9,24 ± 0,54



**Figura 1.** Resultados de P50 (mmHg) obtidos nos estudos funcionais (controle e compostos 5-HMF e Voxelotor). **(A)** Médias e desvios padrão dos valores de P50 nos pHs experimentais 6.5, 7.0 e 7.5. **(B)** Gráficos das Curvas de Dissociação de Oxigênio (CDO) nos estudos conduzidos nos mesmos pHs, mediante presença e ausência de IHP - estão plotadas as curvas médias da triplicata biológica.

Cooperatividade		
Amostra	pH	Constante de Hill ( $n$ ) ± 1DP
Hb <i>stripped</i>	6.5	2.07 ± 0.25
	7	1.89 ± 0.27
	7.5	2.02 ± 0.52
IHP	6.5	1.74 ± 0.26
	7	1.95 ± 0.61
	7.5	2.14 ± 0.14
5-HMF	6.5	1.99 ± 0.08
	7	2.11 ± 0.29
	7.5	2.03 ± 0.10
5-HMF + IHP	6.5	2.33 ± 0.66
	7	1.99 ± 0.03
	7.5	1.88 ± 0.43
Voxelotor	6.5	0.84 ± 0.12
	7	0.89 ± 0.06
	7.5	0.93 ± 0.14
Voxelotor + IHP	6.5	1.77 ± 0.02
	7	2.02 ± 0.13
	7.5	1.99 ± 0.23

**Tabela 1.** Cooperatividade *heme-heme* ( $n$ ) da Hb em diferentes pHs nas amostras controle e na presença de 5-HMF e Voxelotor, com e sem efector alostérico IHP.

## DISCUSSÃO E CONCLUSÃO:

O Voxelotor foi inicialmente projetado para aumentar a afinidade da Hemoglobina S (HbS) pelo oxigênio, favorecendo a conformação relaxada (estado R) e impedindo sua polimerização. Apesar de ter sido projetado para o tratamento da Anemia Falciforme, este composto também pode oferecer novos efeitos que ainda não foram descritos e que poderiam ser explorados para outros fins. Este estudo sugere que o Voxelotor também atua na HbA, podendo aumentar a afinidade de O<sub>2</sub>, estabilizando a conformação R, reduzindo drasticamente a cooperatividade heme-heme e demonstrando uma ligação muito estável entre HbA e Voxelotor. No entanto, com a presença de fosfatos orgânicos, como o IHP, a afinidade de oxigênio da HbA permaneceu aumentada, enquanto a cooperatividade heme-heme foi restabelecida e o Efeito Bohr se manteve presente.

Em conclusão, o Voxelotor aumenta significativamente a afinidade Hb-O<sub>2</sub> em diferentes pHs, particularmente em ambientes ácidos e alcalinos, modulando o alosterismo da Hb de acordo com a presença de H<sup>+</sup> e fosfatos orgânicos. Estas descobertas indicam algumas propriedades inexploradas do Voxelotor na dinâmica de ligação Hb-O<sub>2</sub> e que deve ser mais investigada e que pode ser uma alternativa para condições patológicas de baixa captação pulmonar em associação com acidose, como na SARA.

## BIBLIOGRAFIA:

METCALF, Brian et al. "Discovery of GBT440, an Orally Bioavailable R-State Stabilizer of Sick Cell Hemoglobin." *ACS medicinal chemistry letters* vol. 8,3 321-326, 2017

WOYKE, Simon et al. "Modulation of Hb-O<sub>2</sub> affinity to improve hypoxemia in COVID-19 patients." *Clinical nutrition*, Edinburgh, Scotland, vol. 40,1, p.38-39, 2021

DUFU, Kobina et al. "GBT1118, a potent allosteric modifier of hemoglobin O<sub>2</sub> affinity, increases tolerance to severe hypoxia in mice." *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* vol. 313,2, p. H381-H391, 2017

DANIEL, Yvonne et al. "Haemoglobin oxygen affinity in patients with severe COVID-19 infection." *British journal of haematology* vol. 190,3, p. e126-e127, 2020

ABDULMALIK, Osheiza et al. "5-hydroxymethyl-2-furfural modifies intracellular sickle haemoglobin and inhibits sickling of red blood cells." *British journal of haematology* vol. 128,4, p. 552-61, 2005

YALCIN, Ozlem, and Pedro Cabrales. "Increased hemoglobin O<sub>2</sub> affinity protects during acute hypoxia." ***American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*** vol. 303,3, p. H271-81, 2012

OKSENBERG, Donna et al. "GBT440 increases haemoglobin oxygen affinity, reduces sickling and prolongs RBC half-life in a murine model of sickle cell disease." ***British journal of hematology*** vol. 175,1, p. 141-53, 2016

STEWART, Glenn M et al. "Effects of an allosteric hemoglobin affinity modulator on arterial blood gases and cardiopulmonary responses during normoxic and hypoxic low-intensity exercise." ***Journal of applied physiology*** vol. 128,6 p. 1467-1476, 2020